

Mémoire de fin d'étude présenté pour l'obtention du

Diplôme de Master en sciences et technologies "Agronomie et agroalimentaire"

Spécialité : Systèmes et techniques innovants pour un développement agricole durable
(STIDAD)

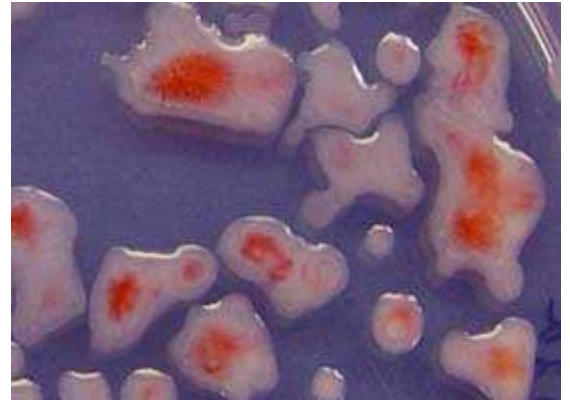
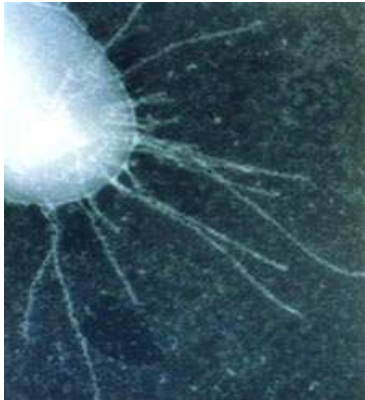
Parcours : Semences et plants méditerranéens et tropicaux (SEPMET)

Structuration génétique d'une population parcellaire de *Ralstonia solanacearum* et impact d'une culture d'aubergine résistante

Par Jérémy Guinard

Stage réalisé du 08 Mars 2012 au 05 Septembre 2012

Soutenance de stage le 20 Septembre 2012 à Montpellier SupAgro



Président du jury

Jean Luc REGNARD

Rapporteur extérieur

Elisabeth FOURNIER

Enseignant rapporteur

Elsa BALLINI

Tuteur pédagogique

Claire NEEMA

Maitre de Stage

Emmanuel WICKER

Sources photos : A gauche : http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/web/img/ralso_big.png, au centre : J. Guinard, à droite : http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Ralstonia/Ralstonia_TZC.jpg

Mémoire de fin d'étude présenté pour l'obtention du
Diplôme de Master en sciences et technologies "Agronomie et agroalimentaire"
Spécialité : Systèmes et techniques innovants pour un développement agricole durable
(STIDAD)
Parcours : Semences et plants méditerranéens et tropicaux (SEPMET)

**Structuration génétique d'une population parcellaire de
Ralstonia solanacearum et impact d'une culture
d'aubergine résistante**

Par Jérémy Guinard

Stage réalisé du 08 Mars 2012 au 05 Septembre 2012

Soutenance de stage le 20 Septembre 2012 à Montpellier SupAgro

<u>Président du jury</u>	Jean Luc REGNARD
<u>Rapporteur extérieur</u>	Elisabeth FOURNIER
<u>Enseignant rapporteur</u>	Elsa BALLINI
<u>Tuteur pédagogique</u>	Claire NEEMA
<u>Maitre de Stage</u>	Emmanuel WICKER

Autorisation de diffusion électronique des mémoires de Montpellier SupAgro

Je soussigné, GUINARD Jérémy, auteur du mémoire intitulé :

Structuration génétique d'une population parcellaire de *Ralstonia solanacearum* et impact d'une culture d'aubergine résistante

Autorise Montpellier SupAgro à diffuser tout ou partie du mémoire mentionné ci-dessus dans un format électronique que l'établissement aura choisi.

Cette autorisation est permanente, sauf notification ultérieure écrite de ma part.

Fait à Montpellier, le

Signature :

Liste des figures

- Figure 1.** Symptômes caractéristique du flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum*.
- Figure 2.** Cycle infectieux de *R. solanacearum*.
- Figure 3.** Photo représentant des colonies de *R. solanacearum* à l'état virulent muqueux et à l'état avirulent rugueux sur milieu Kelman.
- Figure 4.** Phylotypes et clades chez *R. solanacearum* (généalogies de gènes).
- Figure 5.** Correspondance entre phylotypes, clades, séquévars et anciennes classifications du complexe d'espèce *R. solanacearum*.
- Figure 6.** Chronologie des différents essais utilisés cette étude.
- Figure 7.** Représentation des différents échantillonnages réalisés dans la parcelle du Vallon.
- Figure 8.** Echelle symptomatologique du flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* sur l'aubergine.
- Figure 9.** Echelle symptomatologique utilisée par A. Lebeau durant sa thèse (2010) adaptée à la tomate.
- Figure 10.** Exemples de gel d'électrophorèse de PCR multiplexe (Fegan & Prior, 2005) avec le site d'hybridation de ces amorces.
- Figure 11.** Electrophorégramme obtenus après électrophorèse sur le génotypeur automatique ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer.
- Figure 12.** Graphique d'évolution des symptômes du flétrissement bactérien au cours du temps sur toute la parcelle pour l'essai tomate sensible 2012 sur la variété sensible Farmer 209 et pour l'essai Aubergine 2012 cycle 1 sur les 3 microparcelles de la variété sensible E8.
- Figure 13.** Régression linéaire de la corrélation entre la distance génétique ($F_{st}/1-F_{st}$) et le log de la distance géographique des populations extraites de l'essai tomate 2012.
- Figure 14.** Réseau d'haplotypes (« Minimum Spanning Tree ») généré avec le logiciel BioNumerics après calcul des distances de Manhattan.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Emmanuel Wicker, mon maître de stage, pour toutes les connaissances qu'il a pu m'apporter, pour m'avoir permis de faire mes propres erreurs comme mes réussites en étant toujours présent pour me conseiller, et pour sa bonne humeur communicative qui a rendu ce stage agréable. Je le remercie ainsi que Stéphane Poussier, de m'avoir accordé leurs confiances pour mener à bien ce projet et ceux à venir.

Je remercie également les membres du jury composé de Jean Luc Regnard, Elisabeth Fournier, Elsa Ballini et Claire Neema qui ont accepté de s'intéresser à mon travail. Je suis particulièrement reconnaissant envers Claire Neema et Elisabeth Fournier pour les corrections de ce manuscrit.

Je remercie aussi, Carine N'Guessan et Sylvia Salgon, thésarde et VSC dans l'« équipe Ralsto » pour avoir toujours été présentes, de bon conseil, et pour m'avoir encouragé même dans les moments difficiles.

J'exprime toute ma reconnaissance à Jacques Dintinger, pour m'avoir accueilli dans son équipe, à Bernard Reynaud pour m'avoir accueilli au sein de son UMR.

Je tiens à dire un grand merci à Stephanie Javegny, Laetitia Guardini, Fanny Maillot, Murielle Hoareau et Jean Jacques Cheron pour leur aide précieuse, leurs astuces et leurs savoir faire qui m'ont fait gagner un temps précieux ! Je remercie également Sylvain, Jean Michel, Didier et Martial pour leur appui plus que bienfaiteur lors de la manip' 'aubergine'. Merci aussi à Karine Vital et Hélène Delatte pour le coup de main sur Genemapper et sur le génotypeur.

Un grand merci à mes collocs Marie, Mathilde, Eléonore et Félicie qui ont su trouver les mots et les actes pour me reconforter. Merci aussi à mon frère Aurélien qui a réussi à me supporter pendant ces 2 derniers mois de stress, d'indisponibilité et d'ascenseur émotionnel. Merci aux joyeux lurons Tantine, Kez, Nico, Sarah, Domi et Leo pour les diners presque parfaits, les apéros et les bons moments passés ensemble. Merci pour tout, merci d'avoir été là, merci d'être vous ! Enfin je tiens à remercier toutes les personnes du 3P notamment : Mathieu, Marion et Olivier, Lulu, Maeva, Margal, Adrien, Véro, Fred, Pierre, Aline, Alice et Max pour leurs conseils et la place au génotypeur... J'oublie certainement beaucoup de personnes mais ce n'est pas pour autant qu'elles n'ont pas contribué au bon déroulement de ce stage et de ce séjour !

J'avoue, merci pour tout !

Liste des tableaux

- Tableau 1.** Séquence, spécificité et taille des fragments attendus (en paire de bases) des amorces utilisées lors des PCR multiplexe d'identification des souches bactériennes extraites.
- Tableau 2.** Composition du mix réactionnel et programme utilisé pour les PCR multiplexe.
- Tableau 3.** Marqueurs moléculaires utilisés pour le génotypage.
- Tableau 4.** Distribution des 99 haplotypes observés dans 3 collections.
- Tableau 5.** Statistiques de base sur les populations échantillonnées sur tomate 2012.
- Tableau 6.** Statistiques de base sur les populations isolées de l'essai CORETEP 2009.
- Tableau 7.** Statistiques de base sur les populations échantillonnées sur aubergine (cycle 1 2012).
- Tableau 8.** Regroupement des populations selon le billon d'origine issues de l'essai tomate 2012.
- Tableau 9.** Analyse de la variance moléculaire entre billons, entre populations d'un même billon sur locus CMR0985.
- Tableau 10.** Regroupement selon le n° de plant des populations issues de l'essai tomate 2012.
- Tableau 11.** Analyse de la variance moléculaire entre groupes plantes, entre populations d'un même groupe-plante sur locus CMR0985.
- Tableau 12.** Matrice de significativité des tests de différenciation entre groupe de Raymond et Rousset, basé sur les fréquences d'haplotype.
- Tableau 13.** Matrice de significativité des tests de différenciation entre population de tomate sensible de Raymond et Rousset, basé sur les fréquences d'haplotypes.
- Tableau 14.** Regroupement des populations par le compartiment de piégeage des populations issues de l'essai tomate 2012.
- Tableau 15.** Analyse de la variance moléculaire entre compartiments (sol/plante) et entre populations d'un même compartiment.
- Tableau 16.** Estimateurs de déséquilibre de liaison sur les populations échantillonnées sur tomate 2012.
- Tableau 17.** Regroupement en fonction de la plante piège (allèles nuls = données manquantes) des populations issues de l'essai aubergine 2012.
- Tableau 18.** Analyse de variance moléculaire entre les populations issues des espèces d'aubergines résistantes (E6) et sensibles (E8).
- Tableau 19.** Test exact de Raymond et Rousset sur les populations isolées d'E8 et E6.
- Tableau 20.** Estimateurs de déséquilibre de liaison sur les populations échantillonnées sur aubergine.
- Tableau 21.** Regroupement entre les variétés des populations issues de l'essai CORETEP 2009.
- Tableau 22.** Test exact de Raymond et Rousset sur les populations isolées de la CORETEP 2009.
- Tableau 23.** Analyse de variance moléculaire entre variétés de l'essai CORETEP 2009.
- Tableau 24.** Estimateurs de déséquilibre de liaison sur les populations échantillonnées sur CORETEP2009.

Définitions :

Beta-protéobactérie : classe phylogénétique de bactérie. Cette classification s'appuie sur la conservation des séquences d'ARN 16S ribosomique. Les membres de cette classe sont tous des bactéries à coloration Gram négatif.

Virulence : une bactérie est qualifiée de virulente lorsqu'elle est capable de coloniser un hôte.

Avirulence : se dit d'une bactérie qui est reconnue par la plante comme un agent phytopathogène mais qui n'est pas capable de coloniser la plante.

Core-TEP : Core collection de 30 accessions appartenant aux espèces tomate, aubergine et piment mise en place par Aurore Lebeau (thèse, 2010).

Allèle : une des séquences possible (variant génétique) de l'ADN à un locus donné.

Clonal : Issu des divisions successives d'un individu unique.

Conjugaison : méthode non sexuée utilisée par les bactéries afin de s'échanger des informations génétiques. Elle consiste en une transmission de plasmides de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse et, potentiellement, son intégration dans le génome de celle-ci

Dérive génétique : modification aléatoire des fréquences alléliques reposant sur l'échantillonnage au hasard des gamètes.

Déséquilibre de liaison : paramètre qui mesure l'écart à l'association aléatoire de deux allèles situés à des locus différents dans les gamètes. Il mesure le degré de dépendance statistique entre deux caractères, qui sont ici les allèles à deux locus différents. L'existence d'un déséquilibre de liaison entre deux locus n'implique pas une liaison génétique entre ces deux locus.

Haplotype : groupe de gènes au sein d'un organisme hérités ensemble d'un même parent. Les différents allèles de ces différents gènes forment toute sorte de combinaison appelée haplotype.

Locus : terme exclusivement topographique. Emplacement d'un segment d'ADN sur un chromosome défini par son contenu informationnel (gène) ou sa séquence qu'elle soit polymorphe ou non.

Minisatellites (VNTR, Variable Number of Tandem Repeats) : régions du génome caractérisées par la répétition en tandem d'une même séquence d'ADN. Le nombre de répétitions est variable.

Mutation synonyme (silencieuse) : substitution d'un codon par un autre codon qui code pour le même acide aminé (dégénérescence du code génétique).

Polymorphisme : condition dans laquelle une population présente plus d'un allèle au locus considéré.

Transduction : transfert d'ADN bactérien entre bactéries par l'intermédiaire de virus, les bactériophages (ou phages) dits "transducteurs".

Transformation : La transformation est un transfert génétique au cours duquel de l'ADN libre, nu et en solution est introduit dans une bactérie réceptrice, puis intégré au chromosome.

Liste des abréviations

%	Pourcent
°C	Degré Celcius
µL	Microlitre
3P	Pôle de Protection des Plantes
ADNg / ADNr	Acide Désoxyribonucléique Génomique / Ribosomique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analyse Moléculaire de la Variance
AVRDC	Asian Vegetable Research and Development Center
BET	Bromure d'Ehidium
CC	Complexe Clonaux
CFU	Colony Forming Unit = Unité Formant Colonie
CIRAD	Centre de Coopération International pour le Développement Agricole Durable
cm	Centimètre
DL	Déséquilibre de Liaison
DLV	Double Locus Variant
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DUT	Diplôme Universitaire Technique
EDTA	Ethylène Diamine Tetraacetic Acid
EPPO/OEPP	European and Mediterranean Plant Protection Organization / Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
EPS	Exopolysaccharides
g	Gramme
H	Heure
H₂O	Eau
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRR	Homologous Recombination Rate
I_A	Indice d'Association
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
ITS	Internal Transcript Spacer
LG	Linkage Group
m	Mètre
M	Molaire
Mb	Megabase
MgCl₂	Chlorure de magnésium

mL	Mililitre
MLG	Multi Locus Genotyping
MLSA	Multi Locus Sequence Analysis
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MLVA	Multi Locus VNTR Analysis
MST	Minimum Spanning Tree
N°	Numéro
NA	Not Available
n_a	Nombre d'haplotype
NPB	Non Pathogène de la Banane
NS	Non significatif
Pb	Paires de bases
PBS	Phosphate Buffer Salin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRAM	Pôle de Recherche Agro-environnemental de la Martinique
PrCompat	Proportion d'allèle Compatible
pv.	Pathovar
PVBMT	Peuplement Végétale et Bioagresseur en Milieu Tropical
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Random Fragment Length Polymorphism
RILs	Recombinant Imbreed Lines
RPM	Rotation Par Minute
SLV	Single Locus Variant
SSM	Slipped Strand Mispairing
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TEP	Tomato Eggplant Pepper
Tm	Melting temperature
U	Unité
UE	Union Européenne
UMR	Unité Mix de Recherche
UPSUD	Université Paris Sud
UV	Ultra Violet
V	Volt
VES	Van Elsa Smalla
VNTR	Variable Number of Tadem Repetition
VBNC	Viable But Not Culturable

Sommaire

A. Introduction

I. <i>Ralstonia solanacearum</i>, agent du flétrissement bactérien	3
1.1 Gamme d'hôtes	3
1.2 Symptomatologie et cycle infectieux	3
1.3 Dissémination	4
II. L'agent pathogène	4
2.1 Caractéristiques morphologiques et physiologiques	4
2.2 Structure et plasticité du génome	5
2.3 Taxonomie et phylogénie du complexe d'espèce <i>R. solanacearum</i>	6
2.4 Différents moyen de lutte	7
2.4.1 Stratégie de lutte contre le flétrissement bactérien	8
2.4.2 Typologies d'interactions <i>R. solanacearum</i> /Solanacées à graines : pathoprofils et pathotypes	8
III. Génétique des populations pathogènes et durabilité de résistance	9
3.1 Potentiel évolutif des agents pathogènes	9
3.2 Epidémiologie moléculaire : quels marqueurs pour quelle question ?	10
IV. Problématique	11

B. Matériels et Méthodes

I. Matériel végétal et site d'échantillonnage	14
1.1 Matériel végétal	14
1.2 Parcelle expérimentale	14
1.3 Dispositif expérimental 2012	15
1.4 Plans d'échantillonnage	16
II. Suivi d'incidence de maladie sur aubergine et tomate	17
III. Isolement et purification des cultures bactériennes	17
3.1 Extraction des bactéries de la rhizosphère, du xylème et de la tige	17
3.1.1 Extraction de rhizosphère	17
3.1.2 Extraction de tige	18
3.1.3 Extraction des bactéries du sol (phase 1 uniquement)	18
3.2 Purification et mise en collection des cultures bactériennes	18
3.3 Identification des cultures extraites	19
IV. Extraction d'ADN	19
4.1 Amplification des marqueurs VNTRs par multiplexage	20

4.2	Révélation par électrophorèse capillaire sur génotypeur	21
4.3	Traitement des données génétiques.....	22
V.	Analyse des données génétiques	22
5.1	Structuration des populations bactériennes et effet filtre de la plante	22
5.2	Variabilité spatiale	23

C. Résultats

I.	Cinétique d'apparition des symptômes - Variabilité spatiale	24
II.	Echantillonnage et identification des souches bactériennes.....	24
III.	Diversité haplotypique et génétique	25
IV.	Structuration d'une population parcellaire de <i>R. solanacearum</i>.....	26
4.1	Structuration spatiale sur l'essai tomate	26
4.1.1	Test de la structuration spatiale : Isolement par la distance (IBD).	27
4.1.2	Structuration selon le compartiment d'isolement (sol/tige)	28
4.1.3	Réseaux d'haplotypes sur l'essai tomate 2012	28
4.1.4	Variation du DL selon la localisation et le compartiment d'isolement	28
4.2	Effet de l'aubergine sur la diversité et structuration génétiques des populations : Essai Aubergine 2012	29
4.2.1	Effet sur le déséquilibre de liaison	29
4.3	Essai CORETEP 2009 : Effet de l'espèce d'isolement et de la résistance variétale sur le niveau et la distribution de la diversité génétique de <i>R. solanacearum</i>	30
4.3.1	Effet de l'espèce et de la variété sur la distribution de la diversité génétique de <i>R. solanacearum</i>	30
4.3.2	Effet de l'espèce et de la variété sur le niveau de DL des populations de <i>R. solanacearum</i>	30

D. Discussion et perspectives

I.	Les marqueurs utilisés révèlent un faible polymorphisme dans les collections 2009 et 2012	32
II.	La diversité génétique de <i>R. solanacearum</i> observée à l'échelle parcellaire semble faible.....	33
III.	Quelle dynamique spatiale de l'infection de <i>R. solanacearum</i> sur la parcelle ?.....	34
IV.	La plante a un effet de filtre génétique sur les populations pathogènes de <i>R. solanacearum</i>	34
V.	Le fond génétique de l'espèce végétale d'isolement a un effet sur la structure des populations de <i>R. solanacearum</i>	35
VI.	Perspectives	36

Bibliographie	38
----------------------------	-----------

Liste des annexes	45
--------------------------------	-----------

A.Introduction bibliographique

I. *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien

1.1 Gamme d'hôtes

Ralstonia solanacearum est une beta-protéobactérie vasculaire d'origine tellurique de la famille des Burkholderiacées. Cette bactérie est capable d'infecter plus de 250 espèces hôtes appartenant à 54 familles différentes de végétaux, incluant des monocotylédones et des dicotylédones (Hayward, 1964). *R. solanacearum* attaque des cultures alimentaires et ornementales présentant un intérêt économique majeur. Cette phyto bactériose est responsable du flétrissement bactérien sur les Solanacées à graines (tomate, aubergine, piment ou tabac), de la « maladie de Moko » ou « maladie de Bugtok » sur les Musacées (banane-désert, bananier-plantain) (Buddenhagen et al., 1962) ainsi que la pourriture brune sur pomme de terre (ou « Potato Brown Rot »). Elle attaque également les Aracées (Anthurium) ou les Cucurbitacées (Janse & Schans, 1998) (Kelman, 1954) (Wicker et al., 2007).

De part sa gamme d'hôtes ainsi que les pertes économiques qu'elle provoque (plus d'un million de dollars par an selon Elphinstone (Elphinstone, 2005), *R. solanacearum* été inscrite sur la liste A2 des pathogènes de quarantaine de l'Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) et de l'Union Européenne (UE), et classée comme un agent du bio-terrorisme aux États-Unis (Madden & Wheelis, 2003).

1.2 Symptomatologie et cycle infectieux

Les symptômes les plus caractéristiques des plantes infectées par *R. solanacearum* sont un flétrissement irréversible de la plante, comparable à une carence en eau de la plante (**figure 1**) (Poussier, 2000), associé à un brunissement du xylème ainsi qu'à l'apparition de racines adventives au niveau du collet. L'intensité de ces symptômes dépend de nombreux facteurs, qui concernent l'hôte attaqué (espèce, stade physiologique, cultivar), la souche (quantité, qualité de l'inoculum) et les conditions agro-environnementales (humidité, type de sol, température).

En conditions naturelles, le cycle infectieux (**figure 2**) de *R. solanacearum* débute par l'entrée des bactéries dans les tissus racinaires par des blessures ou par des ouvertures naturelles dues à l'émergence de la racine principale ou des racines adventives, ainsi que dans la zone d'élongation au niveau de l'apex racinaire. Cependant, les plantes peuvent aussi être infectées par la bactérie lors d'utilisation d'outils contaminés (sécateurs, machettes, etc.).



Figure 1. Symptômes caractéristique du flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* (Photo : J. Guinard).

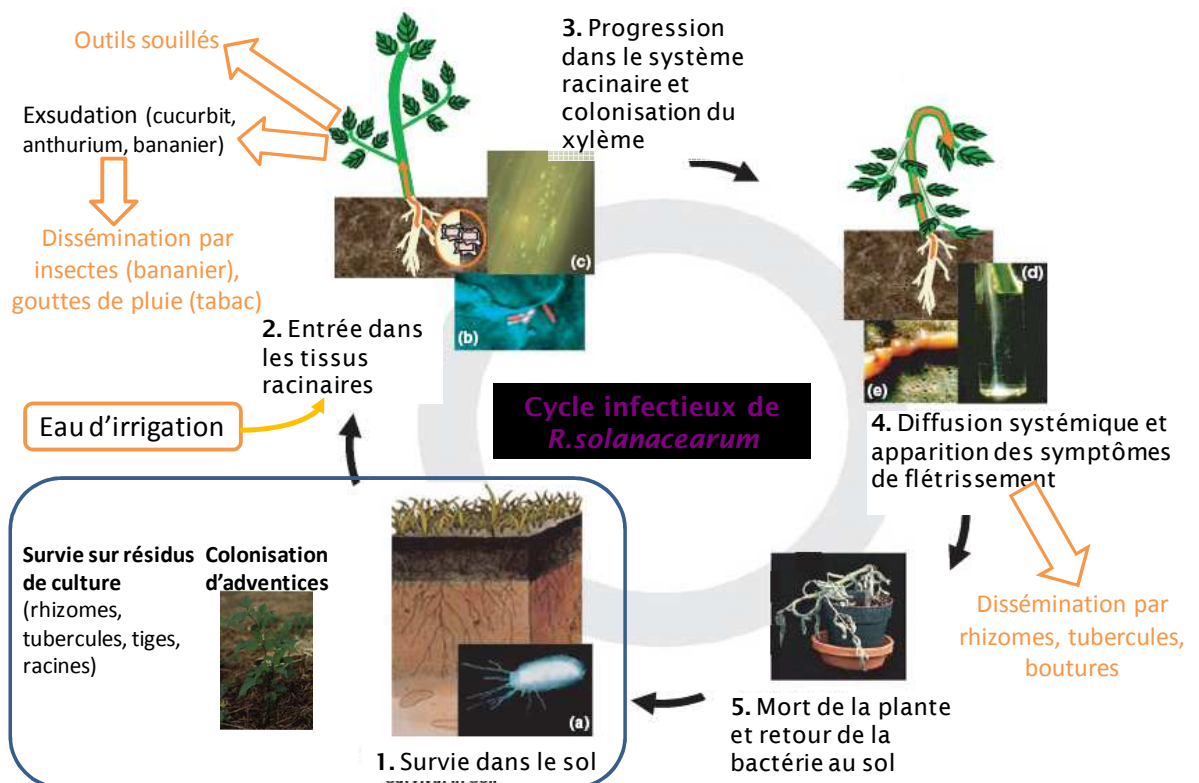


Figure 2. Cycle infectieux de *R. solanacearum* (Wicker, 2004) (Genin, 2010).

Ensuite, les bactéries colonisent rapidement les espaces intercellulaires du parenchyme racinaire, produisant des exopectinases pour pouvoir pénétrer dans les tissus du xylème où elles se multiplient et produisent des exopolysaccharides (EPS) (Vasse et al., 2005). Ces polysaccharides, associés à un déséquilibre du métabolisme des auxines et de l'éthylène, empêchent toute circulation d'eau dans la plante et provoqueraient donc le flétrissement bactérien. Les bactéries progressent alors jusque dans la tige des plantes. C'est à ce stade de l'infection, lorsque la bactérie a envahi les vaisseaux de toutes les parties de la plante, que commencent à apparaître les symptômes, d'abord sur les feuilles jeunes (Wallis & Truter, 1978) puis sur toute la plante, qui finalement meurt. La bactérie retourne alors au sol où elle peut survivre en colonisant des plantes adventices hôtes ou en colonisant la rhizosphère de plantes non hôtes (Alvarez et al., 2008).

1.3 Dissémination

Parmi les nombreuses sources de dissémination de *R. solanacearum*, l'homme est le principal responsable de la propagation de la maladie, localement et mondialement : transmission mécanique par utilisation d'outils contaminés lors d'interventions culturales, eau d'irrigation lessivant les sols contaminés, utilisation de matériel végétal abritant des populations de *R. solanacearum* (Kelman et al., 1994) (Hayward, 1991). La dissémination de cette maladie peut également se faire de plante à plante. En effet, une plante flétrie génère dans le sol une grande quantité de bactéries qui peuvent contaminer les plantes les plus proches (Kelman & Sequeira, 1965).

II. L'agent pathogène

2.1 Caractéristiques morphologiques et physiologiques

Sur milieu semi-sélectif Kelman (Kelman, 1954), *R. solanacearum* possède deux phénotypes très typiques (**figure 3**). Les colonies dites « muqueuses » sont ovoïdes, de couleur crème opaque en raison de son abondante sécrétion d'exopolysaccharides (EPS), avec une coloration rose, voire rouge, décentrée (pigmentation due à la dégradation du tétrazolum en formazan). Les colonies dites « rugueuses » sont rondes, sèches et colorées d'un rouge vif en leur centre (Kelman, 1954). Le phénotype muqueux est virulent tandis que le variant rugueux

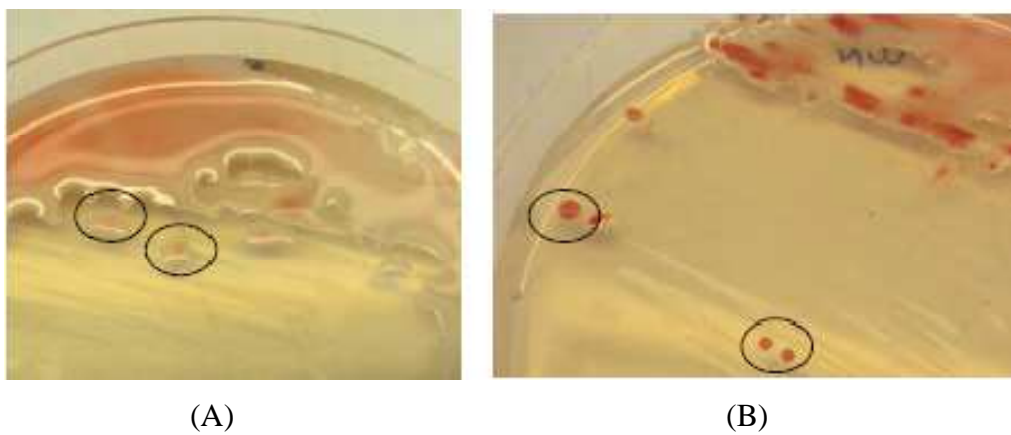


Figure 3. Phylotypes et clades chez *R. solanacearum* (généalogies de gènes), d'après Wicker et al. (2012).

est avirulent. Le passage d'un phénotype muqueux à un phénotype rugueux et réciproquement, spontané et réversible, est induit par les exsudats racinaires de la plante (Poussier et al., 2003). Cette variation de phase est due à des mutations dans le locus *phcA* (Brumbley S. M. et al., 1993) (Poussier et al., 2003). Lors d'extractions de bactéries issues d'échantillons de sol/rhizosphère/tige, la sélection de colonies appartenant à *R. solanacearum* se base sur ces deux phénotypes caractéristiques.

2.2 Structure et plasticité du génome

Le génome de *R. solanacearum* a une taille de 5,7 Mb et est organisé en deux réplicons circulaires : un chromosome de 3,6 Mb et un plasmide de 2,1 Mb (Remenant et al., 2010). Le chromosome possède la plupart des gènes de ménage (80 %) nécessaires au métabolisme primaire de la bactérie (réplication et réparation de l'ADN, fonctions métaboliques essentielles, etc.). Le mégaplasmide porte quant à lui la plupart des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de la bactérie et dans l'adaptation à son environnement, tels que les gènes impliqués dans le système de sécrétion de type 3, les gènes codant les constituants des flagelles ou les gènes contrôlant la biosynthèse extracellulaire des EPS. Ce réplicon est présent chez toutes les souches de *R. solanacearum* et partage une longue co-évolution avec le chromosome (Guidot et al., 2007).

La gamme d'hôtes de *R. solanacearum*, la possibilité de croître en condition stressante (six antibiotiques sont présents dans le milieu Sequeira modifié) et d'y survivre (Bertolla et al., 1999), la capacité d'adaptation rapide de cette bactérie, ainsi que sa variabilité phénotypique (i.e. capacité de changer de phénotype, puis de retourner au phénotype initial) suggèrent une grande plasticité du génome de *R. solanacearum*.

A l'heure actuelle, onze génomes de *R. solanacearum*, représentant les quatre phylotypes, ont été séquencés et assemblés (Gabriel et al., 2006) (Guidot et al., 2009) (Li et al., 2011) (Remenant et al., 2011) (Salanoubat et al., 2002) (Xu et al., 2011) (Remenant et al., 2012) et plusieurs dizaines de génomes sont actuellement en cours de séquençage (Ailloud et Prior, données non publiées 2012 ; Vinatzer données non publiées 2011). Ces séquençages ont montré que la grande plasticité du génome de *R. solanacearum* est due à sa structure en mosaïque, la présence de grandes régions à fort biais d'usage de codon, et d'îlots génomiques, probablement acquis récemment (par transformation, conjugaison ou transduction).

2.3 Taxonomie et phylogénie du complexe d'espèce *R. solanacearum*

Il existe chez *R. solanacearum* une très grande variabilité génotypique et phénotypique au vu de la gamme d'hôtes de cette bactérie. Ainsi cette bactérie a été considérée comme un complexe d'espèces par Gillings & Fahy (Gillings & Fahy, 1994). Différents systèmes de classification ont été présentés afin de caractériser au mieux la diversité existante au sein de ce complexe d'espèces. Les premières classifications comportaient six « biovars » et cinq « races ». Le système « biovar » repose sur la capacité à utiliser et/ou oxyder trois alcools (sorbitol, manitol et dulcitol) et trois disaccharides (lactose, manose, cellobiose) (Hayward, 1964). La classification en races a été définie selon des caractéristiques de la gamme d'hôtes (Denny, 2006). Cependant ces systèmes de classifications représentent mal la variabilité de l'agent pathogène. Le faible pouvoir de discrimination de ces techniques rend les classifications en « biovar » et « race » obsolètes.

Le développement des techniques liées au polymorphisme de l'ADN a révolutionné la taxonomie intra-spécifique de *R. solanacearum*. A l'aide de marqueurs RFLP, Cook & Sequeira (Cook et al., 1989) avaient montré l'existence de deux grandes divisions (Asiaticum et Americanum) et de 41 génotypes multilocus (MLG). Les travaux sur le polymorphisme des séquences partielles des régions ITS (Internal Transcript Spacer) entre l'ADNr 16S et 23S, des gènes *egl*, *hrpB* (Poussier et al., 1999) et *mutS* (Fegan & Prior, 2006) ont amené à proposer un système hiérarchique de classification en phylotypes aujourd'hui largement accepté par la communauté scientifique. Quatre phylotypes distincts ont ainsi été identifiés, correspondant à des souches d'origines géographiques différentes. Le phylotype I rassemble des souches d'origine asiatique, les souches du phylotype II sont d'origine américaine, le phylotype III rassemble des souches d'origine africaine et le phylotype IV d'origine indonésienne. Le phylotype II (américain) est subdivisé en deux groupes : le cluster IIA, avec des souches à large spectre, et le cluster IIB, avec des souches spécialisées sur bananier (souche « moko ») et sur pomme de terre (souche « brown rot »). On retrouve dans ce dernier sous-groupe le séquévar NPB (Non Pathogène sur Bananier) regroupant des souches émergentes de gamme d'hôtes très large, et virulentes même sur les tomates résistantes aux phylotypes I et II (Wicker et al., 2007). Chacun des phylotypes est subdivisé en séquévars. Les souches regroupées en un même séquévar possèdent moins de 1 % de variation sur le loci de 700pb *egl*. Une étude récente basée sur une analyse de séquences multilocus (MLSA-MLST) a permis de réviser la classification en séquévars et de proposer une classification en cinq lignées évolutives (I, IIA, IIB, III, IV) et 8 clades (Wicker et al., 2012). Les différents phylotypes ont

en fait des histoires démographiques et des taux de recombinaison très spécifiques : hautement recombino-gènes et en expansion pour les phylotypes I et III ; hautement recombino-gène mais stable démographiquement pour le phylotype IV (considéré comme le groupe ancestral) ; recombino-gène et en faible expansion pour le phylotype IIA ; clonal pour le phylotype IIB. La correspondance entre phylotypes, clades, séquévars et les anciennes classifications est résumée dans les **figures 4 et 5**.

2.4 Différents moyen de lutte

Différents moyens de lutte sont disponibles pour contrôler l'infection des plantes par cette bactérie. La lutte réglementaire vise à éviter l'importation et la dissémination d'un agent phytopathogène dans une zone où il en est exempt. Pour *R. solanacearum*, la norme OEPP PM 9/3 (OEPP/EPPO, 2004a) (OEPP/EPPO, 2004b) préconise différentes stratégies pour prévenir sa dissémination, telles que la détection, le confinement et l'éradication de la bactérie lorsqu'elle est détectée dans du matériel végétal. La lutte prophylactique vise à réduire le potentiel d'inoculum et la capacité d'infection des bactéries par un ensemble de mesures préventives. Cette lutte passe par exemple par le contrôle des hôtes alternatifs (souvent les adventices) ou par l'utilisation de plants certifiés et contrôlés au champ et en laboratoire (Wicker, 2004). La lutte culturale est un ensemble de techniques qui consiste à raisonner les rotations culturales en diversifiant les espèces cultivées sur une même parcelle. Par exemple, en Martinique il est recommandé d'éviter les successions Solanacées-Cucurbitacées car ces deux familles sont très sensibles à *R. solanacearum* (Wicker et al., 2009). Les luttés physiques et chimiques sont très peu employées en raison de leur coût élevé et de leur dangerosité. L'eau étant une voie de dissémination de la bactérie, il est cependant possible de désinfecter les eaux d'irrigation avec de l'acide paracétique ou du dioxyde de chlore (Wicker, 2004). La lutte biologique utilise quant à elle des bactéries antagonistes ou des souches avirulentes de *R. solanacearum*, comme *Bulkoderia sp.* ou *Bacillus sp.* également connus pour inhiber la croissance de *R. solanacearum*. L'utilisation de mutants avirulents de *R. solanacearum* reste assez limitée car ils ne sont pas de bons compétiteurs avec les souches virulentes au moment de l'entrée dans la plante hôte (Poussier, 2000). Cependant, ces moyens de lutte restent assez limités du fait de la plasticité du génome de *R. solanacearum*, de la stabilité génétique des agents de lutte biologique ou de leur difficulté de mise en place.

2.4.1 Stratégie de lutte contre le flétrissement bactérien

La résistance des plantes aux bioagresseurs peut être définie selon trois critères (Palloix et al., 2009). Le premier critère est le niveau où l'efficacité de la résistance – c'est-à-dire si la résistance est de type qualitative ou quantitative – le deuxième critère est la spécificité d'hôte de cette résistance – c'est-à-dire si la résistance est à large spectre (résistance dite « horizontale ») ou si la résistance est race/souche-spécifique (résistance dite « verticale »). Le dernier critère, la durabilité de la résistance, reste une notion assez complexe qui ne peut être évaluée que lorsque cette résistance se trouve contournée. Une résistance durable peut être définie comme une résistance qui reste effective au champ malgré une utilisation intensive de cultivars portant cette résistance dans des conditions favorables aux attaques des agents pathogènes correspondants (Johnson, 1984).

Chez la tomate la résistance au flétrissement bactérien est de type polygénique et à effet partiel : plusieurs QTL (Quantitative Trait Loci) ont été localisés sur différents chromosomes de la tomate. Chez Hawaii 7996, le QTL majeur, contrôlant des souches de différents phylotypes, se trouve sur le chromosome 6, tandis que d'autres QTLs phylotypes-spécifiques se trouvent sur les chromosomes 3, 4 et 12 (Carmeille et al., 2006) (Wang et al., 2000) (Thoquet et al., 1996). Chez l'aubergine, plusieurs travaux de génétique de résistance ont été publiés, mais sans cartographier le/les QTLs en question, et sans information pertinente sur le statut phylogénétique des souches de *R. solanacearum* contrôlées. Les travaux de thèse d'Aurore Lebeau (Lebeau, 2010) ont permis d'identifier un gène majeur (*ERsI*) dans une population de lignées recombinantes (RILs) issue de l'accession résistante AG91-25. Ce gène est majeur dominant et contrôle totalement trois souches de phylotype I. Il est en revanche contourné par une souche taïwanaise de phylotype I, PSS4 (Lebeau et al., 2012). Par ailleurs, la carte génétique de référence de l'aubergine a été construite sur une population issue du croisement MM195 (*S. aethiopicum*) x MM738 (*S. melongena*) (Doganlar et al., 2002).

2.4.2 Typologies d'interactions *R. solanacearum*/Solanacées à graines : pathoprofils et pathotypes

Au cours de sa thèse, A. Lebeau (2010) a formalisé les différents profils d'interactions entre phylotypes de *R. solanacearum* et Solanacées à graines, en inoculant treize souches de phylotype I, II et III (CORE-RS2) sur une core-collection de trente accessions d'aubergine, tomate et piment (CORETEP, dix cultivars par espèce), choisies selon leurs caractéristiques de

résistance et/ou leurs origines géographiques. Les plus hauts niveaux de résistance ont été observés chez l'aubergine, avec plusieurs cas de résistance totale (0 flétrissement et 0 colonisation), tandis que la tomate est plutôt caractérisée par de la résistance partielle, et le piment par de nombreux phénotypes de « tolérance » (colonisation bactérienne sans symptômes).

Six pathoprofils (*a* à *f*), que l'on peut définir comme des profils d'interaction inter-espèces, ont été identifiés (**figure 7**), qui ne sont pas corrélés à la position phylogénétique des souches (Lebeau et al., 2011) ; les souches de phylotype I se placent ainsi dans trois pathoprofils (*a*, *d*, *e*). Le pathoprofil *f* est virulent et très agressif sur toutes les lignées sauf E2, E4 et E5. Pour chaque espèce séparément, des pathotypes intra-espèce ont aussi été définis : cinq chez la tomate, six chez l'aubergine, trois chez le piment.

Ce grand test de criblage a également permis d'identifier un certain nombre de couples souche*variété présentant des interactions incompatibles (ou résistance totale), ce qui suggère l'existence d'interactions gène-pour-gène entre *R. solanacearum* et l'aubergine, plus particulièrement les accessions E1, E4 et E6, ainsi qu'entre *R. solanacearum* et le piment (P6 et P8).

III. Génétique des populations pathogènes et durabilité de résistance

3.1 Potentiel évolutif des agents pathogènes

L'évolution des êtres vivants, en réponse à la variation des conditions environnementales au cours du temps, est gouvernée par cinq grandes forces évolutives : la sélection naturelle, la mutation, la recombinaison, la migration et la dérive génétique. Ces forces se traduisent par la mutation, la sélection imposée par les gènes de résistance des plantes, le flux de gènes, la taille de la population et la dérive génétique aléatoire et enfin le système de reproduction (Mc Donald & Linde, 2002). Les différentes forces évolutives précédemment nommées vont influencer différemment le potentiel évolutif des populations pathogènes. L'acquisition de matériel génétique étranger par le transfert horizontal de gène (recombinaison) est aussi un mécanisme d'évolution permettant de redistribuer le polymorphisme dans une population, de générer de nouvelles combinaisons virulence/avirulence et va augmenter la diversité haplotypique d'une population pathogène. Concernant les bactéries, la mutation est certainement la source la plus importante de variabilité génétique au niveau de l'individu. Elle peut provoquer une

modification interne de l'information génétique telle qu'une inactivation ou une régulation différentielle des gènes due au brassage intra-chromosomique par exemple.

Les particularités des populations bactériennes résident surtout en leur haploïdie, en leurs grandes tailles, leur temps de génération très court et leur taux de mutation, ainsi qu'en leur mode de reproduction, qu'on a longtemps cru exclusivement clonal. De nombreux travaux récents ont en fait montré que les niveaux de recombinaison homologue (Homologous Recombination Rate, ou HRR) diffèrent grandement entre genres bactériens (Vos & Didelot, 2008). Parmi les bactéries phytopathogènes, *R. solanacearum* été identifiée comme hautement recombinogène : elle est en effet capable d'acquérir et échanger du matériel génétique *in planta* transformation (Bertolla et al., 1999) (Coupat-Goutaland et al., 2011), et les phylotype I, III et IV ont été démontrés comme très recombinogènes (Wicker et al., 2012).

Mc Donald et Linde (2002), en compilant les données agronomiques et bibliographiques sur 34 pathosystèmes, essentiellement fongiques et viraux mais aussi bactériens, ont cherché à faire le lien entre risque estimé et durabilité observée de gènes de résistance. Ils ont ainsi montré que les deux facteurs prépondérants étaient la mutation et la capacité de dispersion (flux de gènes). Pour estimer la durabilité de résistances variétales, il faut donc caractériser au mieux la dynamique évolutive des populations pathogènes : comment apparaît un variant virulent, mais aussi et surtout comment ce variant se répand dans la population hôte.

3.2 Epidémiologie moléculaire : quels marqueurs pour quelle question ?

L'épidémiologie moléculaire cherche à élucider les mécanismes de transmission/dissémination des agents infectieux, l'existence de réservoirs et leur origine. L'épidémiologiste doit pouvoir caractériser avec précision l'isolat bactérien afin d'identifier sa structure génétique par exemple. Pour répondre à ce besoin, le développement d'outils moléculaires reproductibles, standardisés et permettant une caractérisation plus fine (typage) de la bactérie isolée, est nécessaire. La surveillance épidémiologique au niveau mondial via l'utilisation de marqueurs moléculaires a clairement montré son efficacité notamment pour les bactéries monomorphes telles que *Xanthomonas sp.* (Bui Thi Ngoc, 2009). Par exemple, pour le suivi d'une épidémie à l'échelle locale ou sur des pas de temps courts, il est aussi nécessaire de disposer de marqueurs à évolution rapide.

De nombreux outils moléculaires ont été développés afin d'analyser les sources de variabilité ou polymorphisme entre différentes souches. Les marqueurs mini-satellites sont particulièrement adaptés au suivi de populations pathogènes au cours d'une épidémie. Les

VNTR (Variable Number of Tandem Repetition) ou mini-satellites sont des séquences nucléotidiques de dix à cent paires de bases (pb) (Bois, 2003) organisées en répétitions en tandem dans les génomes eucaryotes et procaryotes. L'utilisation des VNTR repose sur le concept de la variation du nombre de répétitions en tandem, due à des mécanismes de mutations divers tel que le glissement de la polymérase suivi de l'absence de réparation de l'ADN lors de sa réplication (*Slipped Strand Mismatching* ou « SSM ») (Levinson & Gutman, 1987) ou le manque d'un mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN. Ces mutations induisent ainsi un polymorphisme du nombre de répétitions. Leur haut niveau de polymorphisme, leur abondance dans le génome, leur rapidité d'évolution, l'absence possible de sélection sur ces marqueurs ainsi que leur pouvoir discriminant très important lorsqu'ils sont utilisés en multiplexage en font de très bons marqueurs moléculaires (Estoup & Angers, 1998).

Le génotypage MLVA (Multilocus VNTR Analysis) est une technique de typage moléculaire qui consiste à déterminer le comportement des VNTR à de multiples loci. Cette technique a été largement utilisée pour décrire la variabilité et la structuration génétique de populations d'espèces bactériennes peu polymorphes, essentiellement des pathogènes humains ou animaux : *Bacillus anthracis* (Keim. P et al., 2004) ou *Legionella pneumophila* (Sola et al., 1998) (Pourcel et al., 2007). Les espèces phytopathogènes étudiées par MLVA sont encore peu nombreuses : *Xanthomonas citri* pv. *citri*, agent du chancre citrique (Bui Thi Ngoc et al., 2009b) (Bui Thi Ngoc et al., 2009a), *Xylella fastidiosa*, de la maladie de Pierce (Colleta-Filho & Machado, 2002), bien que cette technique suscite un intérêt croissant pour des études d'épidémiologie moléculaire.

IV. Problématique

La génétique des populations s'attache à étudier l'impact des différences forces évolutives sur la répartition de la diversité génétique entre les populations et dans les populations. La balance entre les cinq forces évolutives écrites précédemment influence fortement la structure génétique et donc le potentiel évolutif des populations bactériennes.

Plus une bactérie possède un potentiel évolutif fort, plus elle est encline à contourner les résistances variétales ainsi que les autres méthodes de lutte disponibles (fongicide, antibiotique). La connaissance du potentiel évolutif des agents pathogènes que sont les bactéries est déterminante pour la gestion durable des résistances variétales et la mise en place de schémas de sélection appropriés à un pathogène. Une application directe de ces

connaissances est un diagramme de décision d'aide aux programmes de sélection proposé par (Mc Donald & Linde, 2002). Ce diagramme est basé sur le potentiel évolutif des pathogènes et s'adapte facilement aux différents organismes phytopathogènes. Par exemple, pour un pathogène avec un fort taux de recombinaison, un schéma de sélection favorisant la résistance quantitative sera préféré à un pyramidage de gène de résistance. Afin de proposer de telles stratégies de sélection, il est nécessaire de savoir quelles sont les étapes du cycle infectieux qui créent et redistribuent la variabilité au sein de la population de pathogènes considérés, quels sont les mécanismes favorisant la dispersion de nouveaux variants et quels sont les modes de transmission de l'agent pathogène. L'étude de l'histoire évolutive de *R. solanacearum* à l'échelle mondiale a montré que certains phylotypes ont un potentiel évolutif élevé : hauts niveaux de recombinaison et expansion démographique rapide chez le phylotype I et plus secondairement chez le phylotype III. Or c'est le phylotype I qui est le plus répandu dans le monde. Un gène de résistance (*ERsI*) a été identifié chez l'aubergine, qui pourra être déployé ; mais ce gène pourrait être contourné s'il induit un changement rapide de population.

L'étude menée ci-après est inscrite au sein du programme GENETOM impliquant plusieurs équipes de l'UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT) au CIRAD de la Réunion dans le projet GENETOME 1 appelé « Approche de la durabilité de la résistance de l'aubergine au flétrissement bactérien : facteurs génétiques et dynamique évolutive du contournement ». Cette étude est plus spécifiquement inscrite qui visent à :

- i) Comprendre quels sont les déterminants génétiques et moléculaires du contournement de la résistance au flétrissement bactérien en prenant pour modèle le gène majeur (*ERsI*) et dans l'accession E6 chez l'aubergine ;
- ii) Explorer la diversité génétique de la résistance et proposer des stratégies de gestion durable de la/des résistances,
- iii) Transférer le gène majeur de résistance *ErsI* dans une aubergine d'intérêt économique pour le marché local.

Plus précisément, ce stage traitera le cas du flétrissement bactérien en abordant le typage de la population de *Ralstonia solanacearum* au sein d'une parcelle, afin de caractériser les souches et les phylotypes présents, ainsi que la structuration génétique de la population bactérienne et ce à différentes échelles spatio-temporelles, pour répondre aux objectifs suivants :

- Evaluer la diversité génétique de *R. solanacearum* à l'échelle d'une parcelle naturelle.
- Caractériser les déterminants principaux qui structurent une population épidémique de *R. solanacearum* sur une parcelle naturelle : effet de la plante, de la variété, rôle de la distance physique.
- Evaluer l'impact d'une culture sélective (i.e. l'aubergine porteuse d'un gène de résistance majeure, *ERs1*) sur la structuration de cette population.

Les hypothèses plus spécifiques ont été testées au cours de ce stage :

- Il existe une variabilité génétique entre les différentes collections de souches de *R solanacaerum*.
- Une dynamique spatiale de l'infection de cette bactérie est observable sur la parcelle étudiée.
- Il existe un effet filtre de la plante sur les populations bactériennes.
- Il y a un effet du fond génétique de l'espèce végétale sur la structuration des populations.

B. Matériels et Méthodes

I. Matériel végétal et site d'échantillonnage

1.1 Matériel végétal

Dans la première phase de l'expérimentation 2012, le suivi d'incidence du flétrissement bactérien a été mené grâce à l'implantation de la variété de tomate « Farmer 209 » (*Solanum lycopersicum*), connue pour sa grande sensibilité au flétrissement bactérien (AVRDC, 2004, AVRDC, 2003).

Dans la deuxième phase d'expérimentation, ont été implantées deux lignées d'aubergine (*Solanum melongena* L.) dont la résistance/sensibilité vis-à-vis des différents phylotypes et clades de *R. solanacearum* a été caractérisée durant la thèse d'Aurore Lebeau (Lebeau, 2010), (Lebeau et al., 2011). La lignée MM738, codée E8 lors des essais CORETEP 2007-2010 (core-collection « tomato-eggplant-pepper » (Lebeau et al., 2011)) a en effet été typée comme sensible aux six pathoprofiles (groupes de souches partageant le même profil de virulence/agressivité sur tomate, aubergine et piment), présentant de forts taux de flétrissement et de colonisation. La lignée AG91-25, codée E6, s'est révélée hautement résistante aux souches des pathoprofiles A, C et D. Des études de cartographie génétique menées au CIRAD de la Réunion ont démontré que la résistance de E6 aux souches de phylotype I était conférée par la conjonction d'un gène majeur dominant (*ERsI*) sur le LG2 ainsi qu'un QTL de résistance partielle sur le LG3 (Lebeau et al., 2012). La résistance de cette lignée apparaît souche-spécifique et complexe : les souches capables de contourner *ERsI* (par exemple la souche de phylotype I PSS4) sont partiellement contrôlées par un autre QTL sur le LG13, ralentissant la progression des symptômes.

Les semences de ces lignées ont été fournies par l'équipe de Marie-Christine Daunay (INRA Avignon, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet).

1.2 Parcelle expérimentale

La présente étude a été réalisée sur la parcelle expérimentale du Vallon, situé à la station Ligne Paradis CIRAD de Saint Pierre, à la Réunion (21°S, 55.3°E). Cette parcelle est à environ 140 mètres d'altitude et mesure 25 mètres de largeur pour 50 mètres de longueur. De précédentes études (Poussier et al., 2000) ont montré que cette parcelle est naturellement infestée par des souches appartenant au biovar 3 (phylotype I). Depuis lors, plusieurs essais de

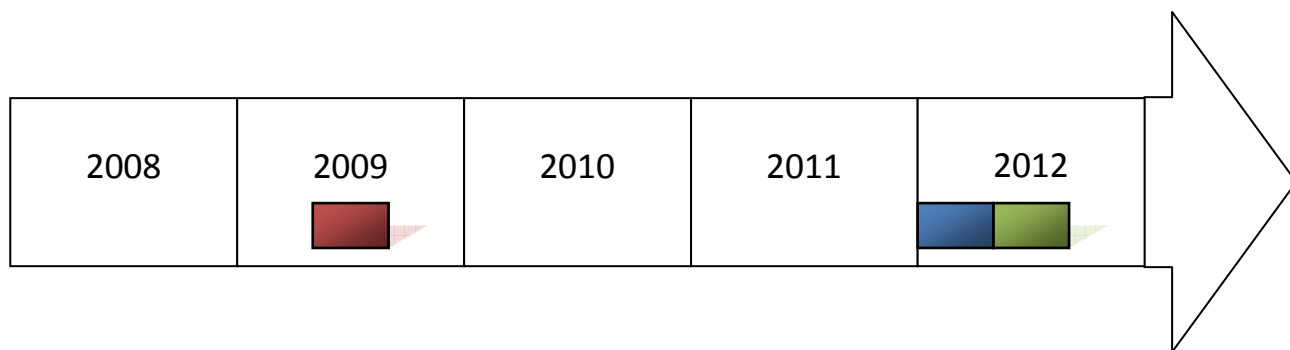


Figure 6. Chronologie des différents essais utilisés cette étude. En rouge, essais de la Core collection de tomate-aubergine-piment dit « CORETEP 2009 » ; en Bleu, essai Tomate sensible 2012 et en Vert essai aubergine sensible (E8) et résistante (E6) 2012.

criblage de résistance variétale ont été menés sur cette parcelle, essentiellement sur solanacées maraîchères. L'essai le plus récent, le criblage de la CORETEP, a été mené en 2009 sur trente lignées de tomate-aubergine-piment sur trois blocs de trois billons (petite butte de terre surélevée). La collection d'isolats récoltés lors de cet essai de mars à septembre s'est révélée entièrement constituée par du phylotype 1 (Carine N'Guessan, données non publiées 2009). Dans notre expérimentation, le dispositif est constitué de onze billons d'1 mètre de large, espacés chacun de 1,2 mètre et recouverts par un paillis de plastique noir. Chaque billon supporte deux rangs de plantes, espacées chacune de 40 cm. Depuis le billonnage, aucun traitement phytosanitaire ni aucune pratique culturale (rotation de culture, labour) n'ont été réalisés.

1.3 Dispositif expérimental 2012

Phase 1 : culture de tomate

La première phase de culture de tomate avait pour objectifs (i) de multiplier l'inoculum naturellement présent dans la parcelle, (ii) de détecter les principaux foyers fortement infestés sur lesquels nous planterons les micro-parcelles d'aubergine, et (iii) de constituer une collection d'isolats collectés sur une culture non – ou peu – sélective pour déterminer la structure génétique de la population de *R. solanacearum* présente dans le sol et dans la tige. Le dispositif comportait neuf billons plantés chacun de deux lignes de cent plants espacés de 40 cm sur chaque ligne (espace inter-ligne de 80 cm), soit dix-huit lignes codées de A à R. Les 1 800 plants de tomate ont tout d'abord été semés et élevés sous serre *insect-proof* puis transférés en plein champ un mois après le semis, le 15 février. L'arrosage et la fertilisation des plantes ont été effectués par un dispositif de goutte à goutte.

Phase 2 : Culture de microparcelles d'aubergine

Nous avons choisi d'implanter six microparcelles de cinquante-deux plants d'aubergine (quatre lignes de treize plants espacés de 40 cm en intra-ligne et de 80 à 120 cm en inter-ligne), à raison de trois parcelles (réplicats) de la lignée sensible (E6) MM738 et trois parcelles de la lignée résistante (E8) AG91-25. Les six micro-parcelles implantées ont été définies d'après le suivi épidémiologique de l'incidence de la maladie sur l'ensemble de la parcelle. Les plants ont été semés, repiqués et élevés comme précédemment en pépinière, avant d'être plantés le 19 avril 2012.

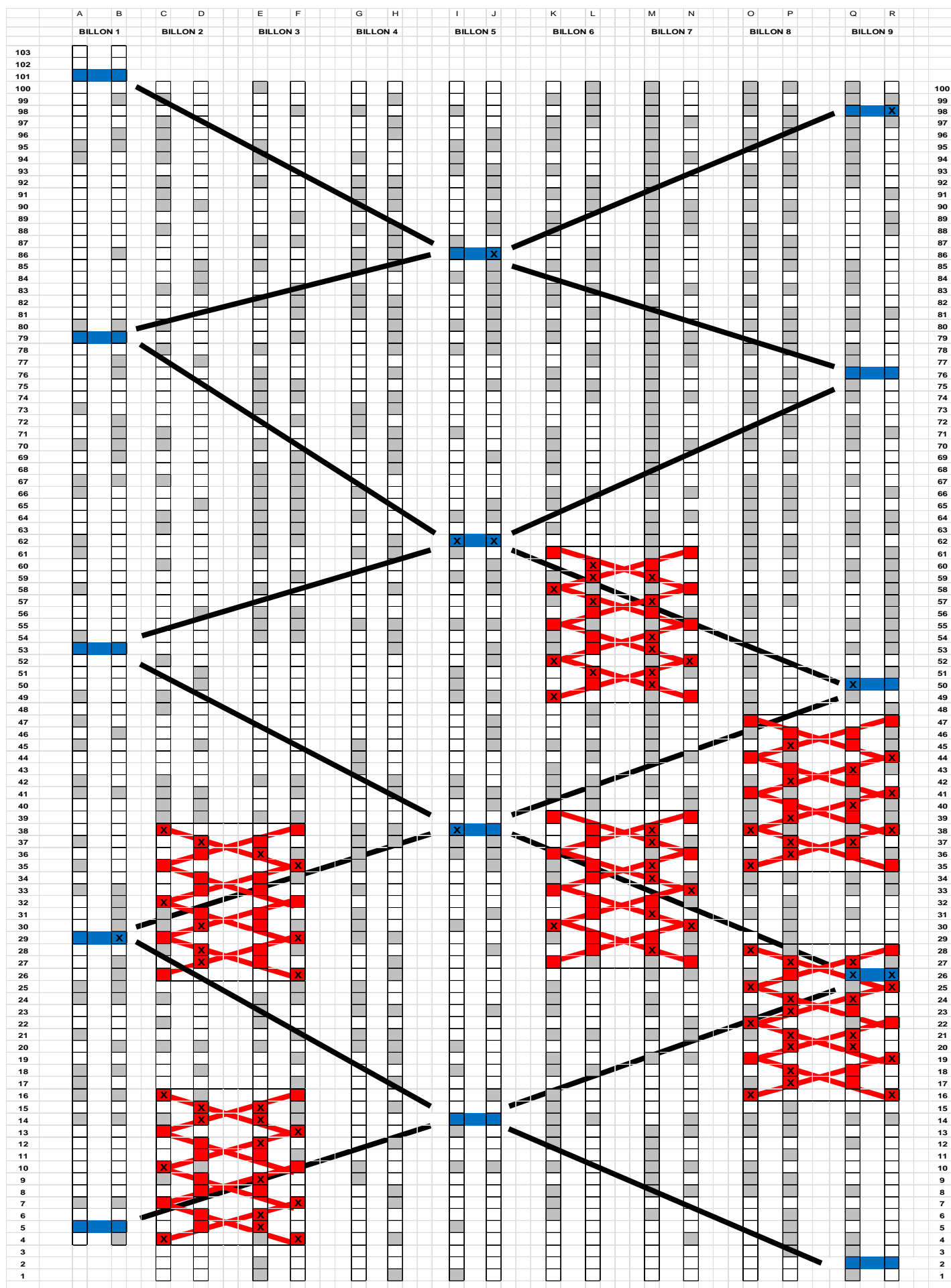


Figure 7. Représentation des différents échantillonnages réalisés dans la parcelle du Vallon. Pour la phase 1 d'échantillonnage, en bleu (1A) sont représentés les points d'échantillonnage pour le premier double W sur toute la parcelle, en rouge (1B) sont représentés les points d'échantillonnage pour 6 les microparcelles. Les carrés gris dans la parcelle représentent les plantes mortes et les X aux points de prélèvements représentent les prélèvements de sols.

La chronologie des essais est résumée dans la **figure 6**.

1.4 Plans d'échantillonnage

Il existe très peu de littérature portant sur les stratégies d'échantillonnage de *R. solanacearum* dans le sol et à l'échelle d'une parcelle infestée. Les quelques références existantes reposent sur des échantillonnages non spatialisés (Poussier et al., 2000) (Grover et al., 2006), ou sont contradictoires sur le choix du meilleur plan de prélèvement, entre échantillonnage en diagonale, en X ou en W (Tavares et al., 2000). Suite aux résultats de deux études (Pradhanang, 1999) (Lin et al., 2009), nous avons choisi d'utiliser un plan d'échantillonnage dit en « double W », à plusieurs échelles. En effet, pour un champ cultivé de faible dimension, un échantillonnage systématique de ce type sera le plus adapté car plus représentatif de la diversité au sein de notre parcelle (Huisin et al., 2008).

Sur la phase 1, deux plans d'échantillonnage ont été appliqués (**figure 7**)

- 1A : Un double W a été positionné sur l'ensemble de la parcelle, sur lequel ont été prélevés systématiquement les plantes (malades ou non), ou des échantillons de sol lorsque les plantes étaient manquantes. Ce premier plan de collecte a porté sur 14 positions en double ligne, soit 28 points d'échantillonnage. Sur chaque plante est mené un isolement des bactéries de la rhizosphère, et un isolement des bactéries présentes dans les tissus vasculaires de la tige. L'objectif étant de collecter au moins 30 isolats par compartiment.
- 1B : A la fin du suivi d'incidence de maladie, les principaux foyers de flétrissement bactérien ont été identifiés. À l'intérieur de ces foyers ont été positionnées six micro-parcelles de cinquante-deux plants (treize plants de longueur sur quatre lignes de largeur, comme précisé précédemment), à raison de deux parcelles par foyer. Dans chacune de ces micro-parcelles, un double W a été positionné, résultant en 26 points de prélèvement. Soit au total, 156 prélèvements de plantes, ou de sol dans le cas où la plante n'est pas récoltable.

Sur la phase 2, toutes les plantes sont prélevées au bout de trois mois de culture. Pour les plantes mortes à l'implantation ou pendant la culture, nous posons l'hypothèse ici qu'il n'y a pas eu d'influence de la culture sur la population bactérienne de l'horizon sol et donc qu'il n'y

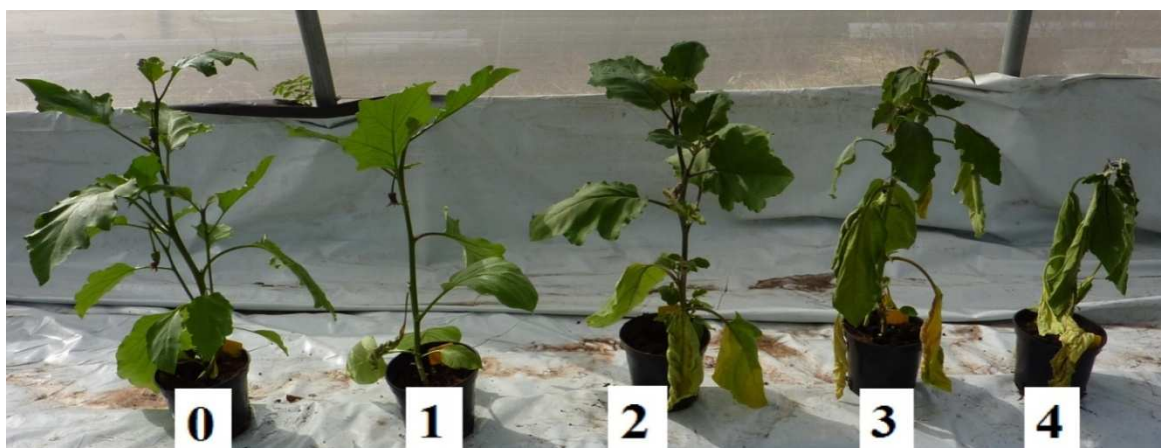


Figure 8. Echelle symptomatologique du flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* sur l'aubergine (Photo : M. Gouy, in A. Lebeau, Thèse 2010).

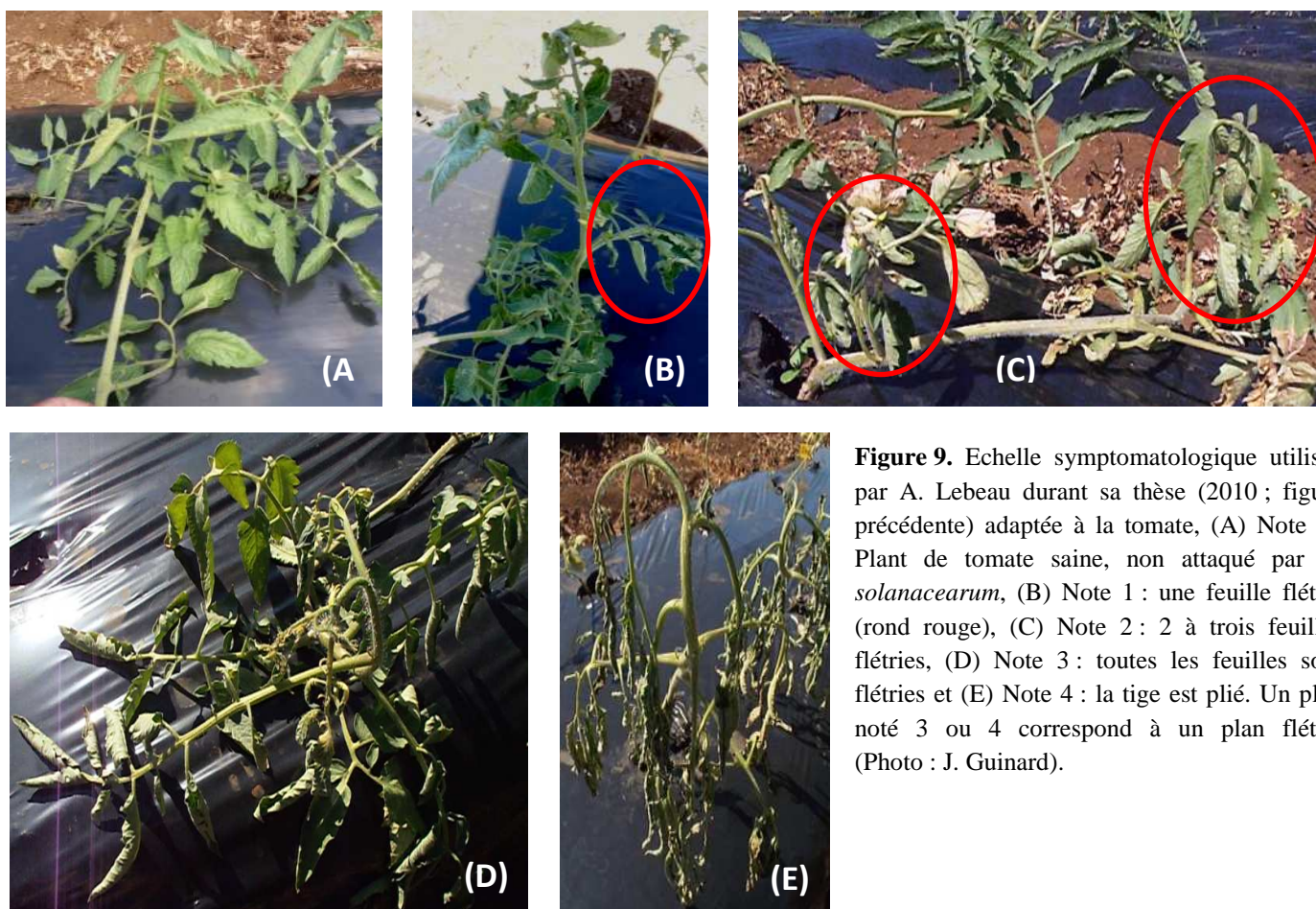


Figure 9. Echelle symptomatologique utilisée par A. Lebeau durant sa thèse (2010 ; figure précédente) adaptée à la tomate, (A) Note 0 : Plant de tomate saine, non attaqué par *R. solanacearum*, (B) Note 1 : une feuille flétrie (rond rouge), (C) Note 2 : 2 à trois feuilles flétries, (D) Note 3 : toutes les feuilles sont flétries et (E) Note 4 : la tige est pliée. Un plan noté 3 ou 4 correspond à un plan flétri (Photo : J. Guinard).

a pas besoin de ré-échantillonner ce compartiment.

Les bactéries ont ensuite été extraites de la rhizosphère et de la tige comme décrit plus bas (3.1). Sur chacune des micro-parcelles, l'effort d'échantillonnage est cette fois réduit à 30 isolats bactériens par compartiment (rhizosphère/xylème) sur trois plantes. Un double W est également disposé, marquant 26 positions de plantes sur lesquelles sont systématiquement prélevés dix isolats de la tige et de la rhizosphère, que la plante soit asymptomatique ou malade ; sur les autres plantes, cinq isolats sont prélevés de la tige et de la rhizosphère.

II. Suivi d'incidence de maladie sur aubergine et tomate

Chaque semaine, une notation de flétrissement est effectuée, selon l'échelle de notation de 0 à 4 utilisée par A. Lebeau (**figures 8 et 9**). Les prélèvements de plants flétris sont réalisés chaque semaine au cours de l'essai en phase 1, tandis que ceux de la phase 2 sont aussi menés à la fin des trois mois de culture pour les plantes restantes. Ces données vont permettre de visualiser la cinétique de progression de la maladie sur la parcelle.

III. Isolement et purification des cultures bactériennes

3.1 Extraction des bactéries de la rhizosphère, du xylème et de la tige

Sur la parcelle, les plants sont arrachés et secoués de manière à éliminer le maximum de terre non adhérente aux racines. Puis la partie aérienne est sectionnée à l'aide d'un sécateur stérilisé à l'alcool et désinfecté entre chaque prélèvement de plante, à environ 10 cm de la base du plant. Puis, le système racinaire et la base de tige sont mis en sac et ramenés au laboratoire. En laboratoire, les tronçons de tige (≈ 4 cm de longueur) sont séparés du système racinaire au niveau du collet.

3.1.1 Extraction de rhizosphère

Le protocole utilisé ici s'inspire des travaux menés au Pôle de Recherche Agro-environnementale de Martinique (PRAM) en détection dans le sol, l'eau et la rhizosphère de cultures assainissantes (Deberdt et al., 2012). Chaque système racinaire est pesé, puis transféré dans un volume de tampon VES (Van Elsas & Smalla, 1997) (composition en **annexe 1**) égal à

20 fois la masse racinaire ; le tout est mis en agitation (120rpm) durant une nuit (12 heures à 28 °C). Ensuite, 50µL de suspension sont étalés en trois secteurs sur milieu Sequeira modifié (Poussier, 2000) (composition en **annexe 1**), à raison de trois boîtes par échantillon.

3.1.2 Extraction de tige

Les morceaux de tige sont stérilisés par trempage dans de l'alcool à 96 ° puis flambés. Les deux extrémités de la tige (1 cm de chaque côté) sont ensuite coupées et le fragment de tige restant est dilacéré et laissé à macérer 15 minutes dans 5 mL de tampon Tris (2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol, 0.01 M, pH = 7,2). Puis le macérât de chaque échantillon est étalé sur trois boîtes de milieu Séqueira modifié selon la technique des « trois secteurs » (50µL/boîte).

3.1.3 Extraction des bactéries du sol (phase 1 uniquement)

Dans le cas où les plantes à échantillonner sont mortes en plein champ, un échantillon de terre de l'horizon 0-20 cm est prélevé à l'aide d'une tarière, puis transféré en sac plastique. Au laboratoire, l'échantillon frais est homogénéisé puis 20 grammes sont pesés et transférés dans 200 mL de tampon VES dans un bécher de 500 mL. Le bécher est ensuite mis en agitation environ 4 heures à 120 rpm. Puis, 50 µl de macérât/boîte sont étalés sur trois boîtes comme précisé précédemment. Le milieu utilisé ici est du milieu Sequeira amendé de 5 g.L⁻¹ pyruvate (Imazaki & Nakaho, 2010) (composition en **annexe1**). Le sodium pyruvate dégrade le peroxyde d'hydrogène et restaure la cultivabilité de *R. solanacearum* sur milieu gélosé.

3.2 Purification et mise en collection des cultures bactériennes

Après une croissance de quatre jours sur milieu Sequeira modifié à 28 °C, les colonies caractéristiques de *R. solanacearum* (colonies blanc crème avec une coloration rouge au centre, muqueuses, de forme ovoïde) sont ensuite repiquées sur milieu Sequeira modifié pour purification. Après 48 heures d'incubation à 28 °C, une colonie par boîte est prélevée de chaque nouvelle culture, puis étalée en « pâté » sur milieu Kelman (Kelman, 1954) (composition en **annexe 1**), afin d'obtenir une quantité suffisante de bactéries pour la suite des expériences. Les bactéries repiquées sont incubées entre 24 et 48 heures puis mises en suspension dans de l'H₂O HPLC (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, Missouri, Etats-Unis), à deux

Tableau 1. Séquence, spécificité et taille des fragments attendus (en paire de bases) des amorces utilisées lors des PCR multiplexe d'identification des souches bactériennes extraites (Fegan & Prior, 2005) (Opina et al., 1997).

Primers	Séquences (5' à 3')	Spécificité	Taille de fragment attendu
Nmult21 : 1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	Phylotype I	144 bp
Nmult21 : 2F	AAGTTATGGACGGTGGGAAGTC	Phylotype II	372 bp
Nmult23 : AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	Phylotype III	91 bp
Nmult22 : InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	Phylotype IV	213 bp
Nmult22 : RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA	Tous les phylotypes	NA

Tableau 2. (A) Composition du mix réactionnel pour un échantillon et (B) programme utilisé pour les PCR multiplexes.

(A)	Composition	Volume (µl)	(B)	Programme PCR			
	H2O HPLC	11,55		Dénaturation initiale:	96°	5 min	
	Tampon GOTAQ	5,00		Dénaturation:	94°	30 sec	30 cycles
	5XPCR				59°	90 sec	
	MgCl ₂ (25 mM)	2,00			72°	90 sec	
	DMSO	1,25		Elongation finale:	72°	20 min	
	dNTP (10mM)	0,50		Conservation:	4°	∞	
	10X Primer mix	2,50					
	GOTaq (5U/µL)	0,20					
	TOTAL	23					

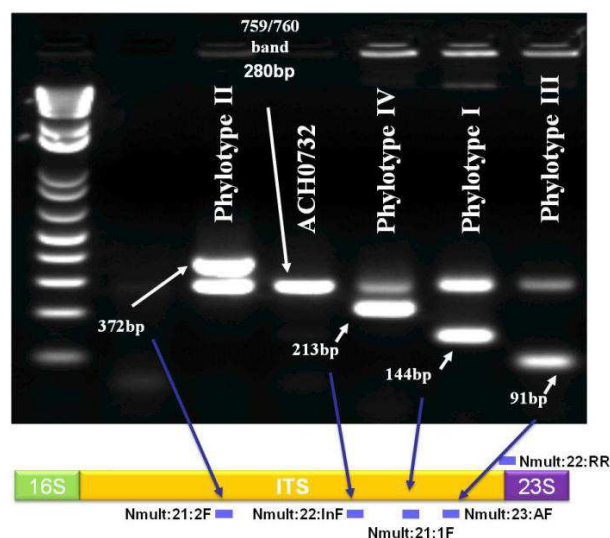


Figure 10. Exemples de gel d'électrophorèse de PCR multiplexe (Fegan & Prior, 2005) avec le site d'hybridation de ces amorces. Puits n°1 : marqueur de poids moléculaire 100pb, Puits n°2 : témoin négatif (espèce autre que *R. solanacearum*), Puits n°3 : souche représentative du phylotype II (ANT307 - RUN0016), Puits n°4 : ACH0732, Puits n°5 : souche représentative du phylotype IV (MAAF301558 - RUN0071), Puits n°6 : souche représentative du phylotype I (GMI1000 - RUN0054), Puits n°7 : souche représentative du phylotype III (CFBP3059 - RUN0039).

concentrations différentes. La première mise en suspension est à une concentration de $\sim 10^8$ CFU.mL⁻¹ (une anse de 1 µl dans 1 mL d'H₂O HPLC) pour la réalisation de PCR multiplexe et une autre suspension à $\sim 10^9$ CFU.mL⁻¹ (une anse de 10 µL dans 1 mL d'H₂O HPLC) pour l'extraction d'ADN. Pour cette étape de mise en collection, un maximum de trente isolats bactériens a été extrait par échantillon et par compartiment (= rhizosphère ou tige).

3.3 Identification des cultures extraites

Pour vérifier leur appartenance au complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*, les bactéries sont ensuite typées par PCR multiplexe (Fegan & Prior, 2005). Un premier couple d'amorce, 759F/760R, à été développé (Opina et al., 1997), permettant d'identifier les souches de *R. solanacearum*. Toutes les souches de *R. solanacearum* génèrent un fragment de 280 pb spécifique à ce complexe d'espèce. Le phylotype des souches est déterminé à l'aide d'amorces ciblant la région génomique de l'ITS (Internal Transcript Spacer). Chaque phylotype génère un fragment de différente taille, résumé dans la **figure 10** et dans le **tableau 1**. L'amplification PCR est menée directement sur la suspension bactérienne à 10^8 CFU.mL⁻¹ (2 µL) ; la composition du mélange réactionnel est indiquée dans le **tableau 2A**. Les amplifications PCR sont ensuite réalisées à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied BioSystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) en utilisant le programme décrit dans le **tableau 2B**. Les amplifiats sont ensuite déposés sur gel d'agarose 2 % (8 µl de produit PCR par puits) pour électrophorèse et révélation. Après une électrophorèse (1 h 30 à 120 Volts), les gels sont révélés quinze minutes dans un bain de Bromure d'Ethidium (BET, 2 µg.mL⁻¹) puis rincés dix minutes dans un bain de TAE 1X, et révélés aux UV à l'aide d'un transilluminateur ETX-F26.M (VilbertLourmat, Allemagne) et d'une caméra CFW-1300 (Scion Corporation, Maryland, États-Unis) pour finalement être visualisés grâce au logiciel PerfectImage V7.6 (ClaraVision, Essonne, France). La taille des amplicons est déterminée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire 100 pb (New-England BioLabs Inc., Ipswich, MA, États-Unis) et avec des témoins positifs utilisés en routine dans l'équipe (**figure 10**).

IV. Extraction d'ADN

Lorsque les bactéries sont identifiées comme appartenant au complexe d'espèce de *R. solanacearum*, l'ADN est extrait des suspensions à 10^9 CFU.mL⁻¹ en utilisant le Kit Blood &

Tableau 3. Récapitulatif de l'intervalle du nombre de répétition, nombre d'allèles détecté, nombre d'haplotypes, diversité allélique et spécificité des marqueurs moléculaires utilisés pour génotyper les souches de *R. solanacearum* (N°Guessan et al., 2012, In prep.)

Name	Interval du nombre de répétition	Nombre d'allèles	Nombre d'haplotypes n _a et diversité allélique H				MIX	Locus	MLVA spécifiques de phylotype				Tm
			Pour le phylotype I	Pour le phylotype III	Pour le phylotype II	Pour le phylotype IV			I	III	II	IV	
ch0127	1- 10	8	7 (0.49)	3 (0.55)	2 (0.34)	2 (0.25)	MIX01	ch0127	X	X	X	X	60°C
ch1459	4- 21	12	11 (0.81)	9 (0.87)	1 (NA)	1 (NA)	MIX01	ch1459	X	X			
ch1549	1- 15	12	10 (0.65)	1 (0)	1 (0)	1 (NA)	MIX01	ch1549	X				
ch0754C	9- 52	27	13 (0.78)	15 (0.95)	2 (1)	1 (NA)	MIX03	ch0754C	X	X			63°C
ch1844	4- 10	4	4 (0.22)	NA	NA	1 (NA)	MIX03	ch1844	X				
ch2433	1- 14	11	8 (0.56)	8 (0.81)	2 (0.16)	2 (0.5)	MIX03	ch2433	X	X			60°C
CFBPch2508	2- 7	6	2 (0.25)	3 (0.27)	4 (0.64)	2 (0.22)	MIX04	CFBPch2508	X	X	X	X	
CMR026	1- 20	15	2 (0.02)	13 (0.92)	2 (0.02)	2 (0.55)	MIX04	CMR026	X	X	X	X	
CMR2699	1- 14	11	8 (0.57)	8 (0.77)	4 (0.61)	2 (0.22)	MIX04	CMR2699	X	X	X	X	
M0786	1- 9	5	2 (0.10)	2 (0.10)	3 (0.06)	1 (0)	MIX04	M0786	X	X	X	X	60°C
CFBPch0847	1- 6	6	1 (0)	1 (0)	6 (0.52)	2 (0.28)	MIX05	CFBPch0847F			X	X	
IP4134	2- 15	10	1 (0)	1 (0)	8 (0.74)	2 (1)	MIX05	IP4134-F			X		
PSImp1685	1- 32	19	11 (0.82)	7 (0.96)	1 (0)	4 (0.86)	MIX05	PSImp1685-F	X			X	63°C
CFBPch1968B	1- 9	8	1 (0)	1 (0)	8 (0.32)	1 (0)	MIX06	CFBPch1968B-F			X		
ch0827	1- 8	8	3 (0.25)	6 (0.72)	1 (NA)	2 (0.25)	MIX06	ch0827-F	X	X		X	
CMR1071	4- 35	19	9 (0.76)	13 (0.89)	3 (1)	1 (NA)	MIX06	CMR1071-F	X	X			
CMRmp0985	5- 96	22	20 (0.86)	13 (0.92)	2 (1)	2 (1)	MIX06	CMRmp0985-F	X	X			60°C
CFBPch2866	1- 4	3	1 (0)	NA	3 (0.14)	NA	MIX07	CFBPch2866-F					
IP0100	1- 12	9	1 (0)	NA	9 (0.8)	1 (NA)	MIX07	IP0100-F			X		
M1936	3- 15	11	2 (0.66)	NA	11 (0.66)	2 (0.5)	MIX07	M1936-F			X		
M5321	1- 5	4	1 (0)	NA	4 (0.57)	NA	MIX07	M5321-F			X		
ch0214	1- 2	2	2 (0.01)	1 (0)	NA	1 (0)	Loci monomorphes	TOTAL	14	11	11	8	
ch0692	2	1	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)							
ch1128	2	1	1 (0)	1 (0)	NA	1 (0)							
ch2453	2	1	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)							
ch3178	2	1	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)							
ch0587	1- 2	2	1 (0)	1 (NA)	1 (0)	1 (0)							

Tissue (Qiagen ®) selon protocole préconisé par le fournisseur (**annexe 2**). La quantification et le contrôle de la qualité de l'ADN sont ensuite réalisés par spectrophotométrie grâce au NanoDrop® ND-8000 et au logiciel ND8000 V2.2.1 (NanoDrop Technologies Inc., DE 19810 États-Unis). Les ADN bactériens ont ensuite été dilués à $2 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ puis conservés à -30°C jusqu'à leur utilisation.

4.1 Amplification des marqueurs VNTRs par multiplexage

Vingt-sept loci VNTR ont été sélectionnés pour l'analyse du polymorphisme de répétitions en tandem chez le complexe d'espèces *R. solanacearum* (thèse de Carine N'Guessan, 2012). Hormis cette étude sur trois cent trente-sept souches, le polymorphisme de ces marqueurs est inconnu. Six loci sur les 27 développés se sont relevés monomorphes pour la collection mondiale testée. De plus, seuls cinq loci sont présents dans les quatre phylotypes et tous les autres sont phylotypes-spécifiques. Ainsi, quatre schémas MLVA ont été développés : (i) treize loci pour l'analyse du phylotype 1 ; (ii) douze loci pour l'analyse du phylotype III ; (iii) onze loci pour l'analyse du phylotype II ; (iv) sept loci pour l'analyse du phylotype IV (**tableau 3**) (N'Guessan A.C et al., 2012, in prep.). Les schémas MLVA utilisés seront choisis en fonction des phylotypes identifiés dans la collection de bactéries extraite de la parcelle expérimentale du Vallon.

Le multiplexage d'amorces PCR permet d'analyser jusqu'à quatre loci en une réaction. À ce stade, des amorces « forward » marquées par un fluorophore sont utilisées: FAM (bleu), VIC (vert), NED (noir), PET (rouge). Six pools de trois ou quatre paires d'amorces correspondant à chaque loci ont été constitués, puis testés en PCR multiplexe en utilisant les kits « Type-It Microsatellite PCR kit » et « Multiplex PCR kit » (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les réactions PCR de multiplexage ont préalablement été optimisées (N'Guessan A.C et al., 2012, in prep.) suivant les indications du fournisseur Qiagen, en testant trois températures d'hybridation (57°C , 60°C , 63°C) pour chaque mix. Le mélange réactionnel ($15 \mu\text{L}$) est composé de $0.2 \mu\text{M}$ de chaque amorce, 1X Qiagen Multiplex Master Mix, 0.5X de Q-solution et $2 \mu\text{L}$ d'ADN bactérien à $2 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

Les réactions PCR, menées dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), débutent par (i) une phase de dénaturation « hot start » de 15 minutes à 95°C , suivi de (ii) 25 cycles de trente secondes à 94°C , 90 secondes à 60°C (MIX1, 4, 5, 7) ou 63°C (MIX3 et 6), et 90 secondes à 72°C et suivi (iii) d'une phase finale de 30 minutes à 60°C (N'Guessan A.C et al., 2012, in prep.).

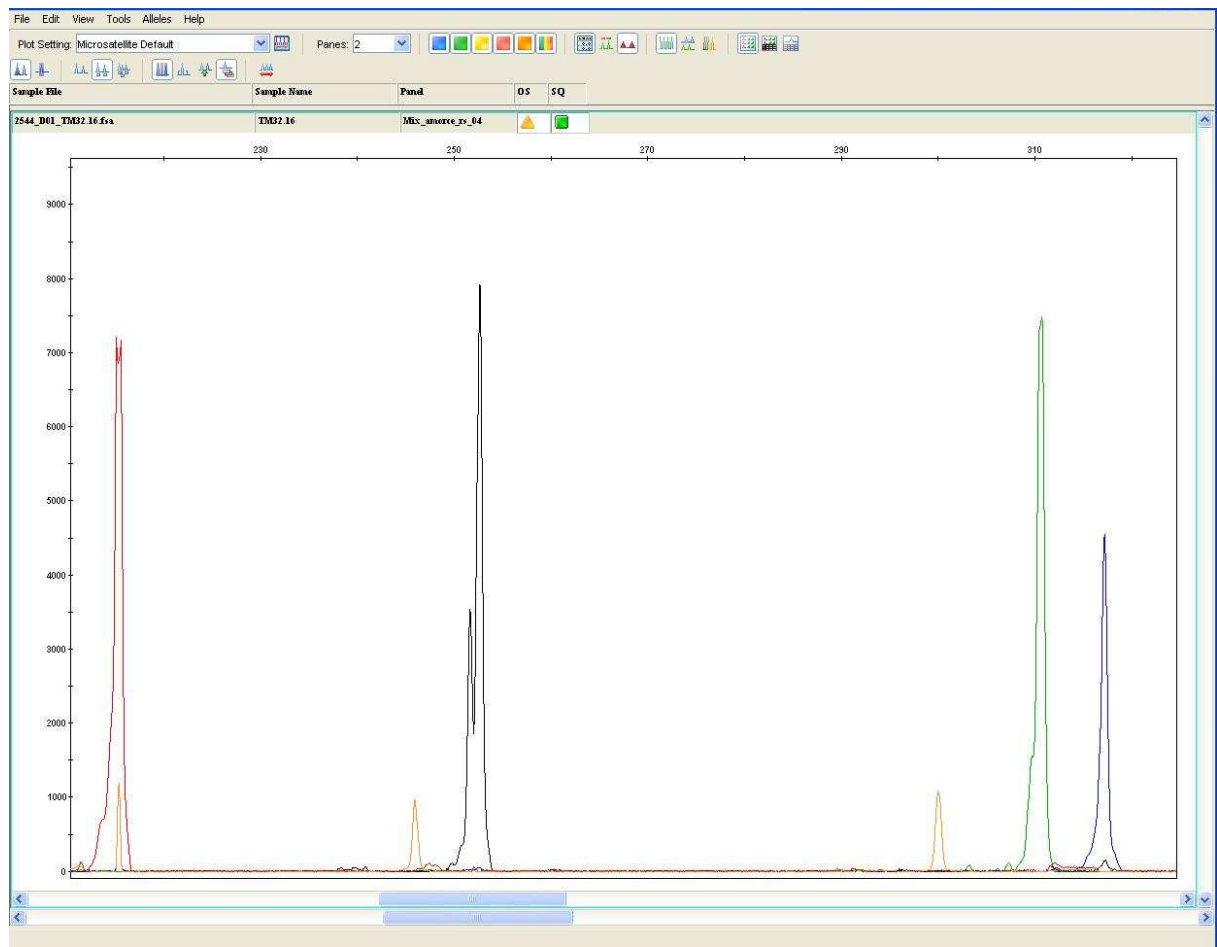


Figure 11. Electrophorégramme obtenu après électrophorèse sur le génotypeur automatique ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Les pics oranges correspondent au marqueur de taille Genescan 500 LIZ Size Standard. Les pics des quatre autres couleurs correspondent aux quatre paires d'amorces marquées du mix d'amorces utilisé.

4.2 Révélation par électrophorèse capillaire sur génotypeur

L'électrophorèse capillaire est menée sur le génotypeur automatique ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer, piloté par le logiciel Foundation Data Collection 3,0 (Applied BioSystems). Avant cette étape, un test préliminaire de dilution ($1/20^e$, $1/50^e$, $1/100^e$, $1/200^e$) est réalisé pour déterminer la dilution appropriée pour chaque pool d'amorces.

Après obtention de la bonne dilution, 1 μ L de chaque produit PCR dilué est mélangé à 10.7 μ L de Formamide et 0.3 μ L de marqueur de taille Genescan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) marqué par un fluorophore orange (LIZ). Les échantillons sont ensuite dénaturés à 95 °C pendant 5 minutes dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied BioSystems), puis incubés 5 minutes dans de la glace afin d'éviter la renaturation de l'ADN. Les fragments amplifiés migrent ensuite dans un gel de polyacrylamide à l'intérieur de capillaires, à une vitesse dépendant de leur taille, et un laser enregistre leur passage en captant la réémission du fluorochrome de l'amorce marquée. Les résultats sont visualisés avec le logiciel GeneMapper v.4 (Applied Biosystems). Le passage de chaque fragment (marqueur de taille compris) est révélé par un pic de couleur (correspondant au fluorochrome), correspondant à une taille en paires de bases et permettant ainsi de déterminer la taille des allèles de chaque individu pour les marqueurs considérés.

Les résultats de génotypage sont des électrophorégrammes de différentes couleurs correspondant à chaque loci pour chaque souche (**figure 11**). Ces résultats sont analysés avec le logiciel Genemapper 4.0 (Applied Biosystems).

Procédure de validation des tailles de pics sous Genemapper :

Une méthode d'analyse a été paramétrée permettant ainsi le choix d'un algorithme d'analyse adapté à des individus haploïdes (ex. : détection d'un seul allèle par marqueur). Ainsi le logiciel détecte les pics d'électrophorégramme et leur assigne une taille ainsi qu'une qualité de pic. N'Guessan *et al.*, (2012, en préparation) ont montré que pour les souches du phylotype I, le nombre de répétitions n'excédait pas 30, aussi la taille des marqueurs (Panel set) a été paramétrée afin de détecter des amplifiats ayant une taille équivalent à 1 et 30 répétitions (**tableaux en annexe 3**). On obtient alors un tableau de données de tailles de fragments pour chaque locus amplifié.

4.3 Traitement des données génétiques

Dans un premier temps, il est nécessaire d'ajuster les tailles observées dans chaque run aux tailles attendues pour chaque locus. Le reformatage du tableau et l'ajustement des tailles d'allèle est effectué avec le logiciel R 2.15 (R Development Core Team, 2010) (**script en annexe 4**). Les tailles d'allèles sont ensuite transformées en nombre de répétitions de motifs, en fonction de la taille de chaque motif et la taille du fragment amplifié (N'Guessan et al., 2012, en préparation), de façon à obtenir le profil allélique (nombre de répétitions du motif) de chaque locus. Cette conversion a été réalisée sous Excel en utilisant la formule : nombre de répétition = (observé - taille hors VNTR) / taille du motif.

V. Analyse des données génétiques

5.1 Structuration des populations bactériennes et effet filtre de la plante

La détermination des différents haplotypes (nombre et profil) est réalisée sous GenALEX 6.0 (Genetic Analysis in Excel) (Peakall & Smouse, 2006). L'indice de diversité de Nei (Nei, M, 1973), le nombre d'allèles, les richesses alléliques ont été calculées à l'aide des logiciels FSTAT V2.9.3 (<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>) et ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Les richesses alléliques totales et privées ont été calculées par la méthode de raréfaction sous HP-RARE (Kalinowski, 2005). La différenciation génétique entre populations isolées de plante ou de sol a été mesurée par le coefficient de différenciation F_{st} sous FSTAT V2.9.3. en utilisant 10000 permutations et en effectuant une comparaison de la significativité des résultats au seuil de 5 % (p-value = 0.05) ; nous avons aussi utilisé le test exact de différenciation de Raymond & Rousset (Raymond et Rousset, 1995) basé sur les fréquences d'haplotypes.

Pour tester la structuration de la variation moléculaire que nous observons entre nos différentes échelles d'étude (trois facteurs ont été testés : structuration selon le compartiment de chaque plante, structuration entre les plantes sur un même billon entre groupe de plantes géographiquement proches et structuration entre billons), nous avons effectué plusieurs analyses de variance moléculaire (AMOVA) sous ARLEQUIN 3.5. Pour chaque population définie, nous avons également testé l'existence de déséquilibre de liaison entre les loci par le calcul de l'Indice d'Association I_a et rBarD avec MultiLocus v1.2 (Agapow & Burst, 2000,

Agapow & Burt, 2001). Ceci nous permet de tester l'existence de phénomènes de recombinaison dans nos populations.

5.2 Variabilité spatiale

L'isolement par la distance repose sur le concept que la différence génétique entre deux populations augmente lorsque la distance géographique augmente (Wright, S, 1951). Ainsi, on cherche ici à tester la significativité de corrélation entre les distances génétique et géographique. Les coordonnées X et Y de chaque plante ont été déterminées en transposant la parcelle du Vallon dans un repère orthonormé positif en prenant (0 ; 0) (soit ligne A ; position – 2 sur **figure 7**) comme centre du repère. Ces coordonnées ont permis de calculer la distance euclidienne entre chaque population en créant une matrice des distances physiques (en centimètres) grâce au logiciel R. Un tableau est ensuite construit, assemblant la demi-matrice des distances physiques dans la partie inférieure et la demi-matrice des distances génétiques dans la partie supérieure (distance de Slatkin, appelé aussi distance de Rousset, $F_{st} / (1 - F_{st})$, calculée sous ARLEQUIN). Le jeu de données est ensuite chargé sur le site internet IBDWS (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>) qui teste la significativité de corrélation entre la distance génétique et la distance physique (IBD en une dimension) et le logarithme naturel de cette distance (IBD en deux dimensions) (Rousset, 1997).

Le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) est utilisé afin de déterminer les relations épidémiologiques entre souches. Les réseaux d'haplotypes aux différentes échelles d'étude sont reconstruits par des « Minimum SpanningTrees », qui tiennent compte du nombre de mutations (variation de nombre de répétitions) entre haplotypes. Cette analyse permet de distinguer différents complexes clonaux, et leur haplotype fondateur. Les génotypes qui ont un profil allélique différent d'un locus du génotype fondateur seront appelés SLV pour « Single Locus Variant » et ceux différant de deux loci seront nommés DLV pour « Double Locus Variant ».

C. Résultats

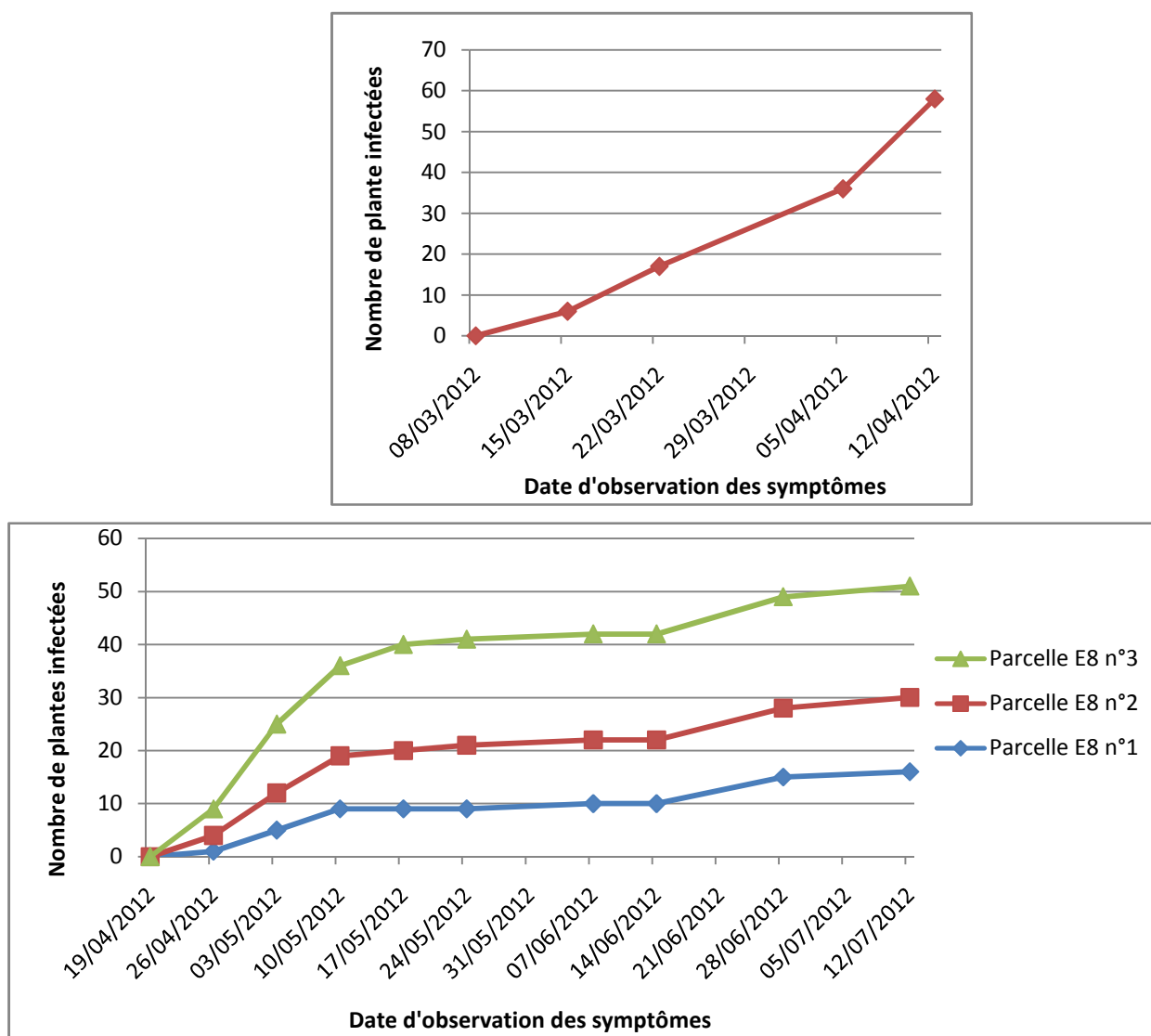


Figure 12. Graphique d'évolution des symptômes du flétrissement bactérien au cours du temps sur toute la parcelle pour l'essai tomate sensible 2012 sur la variété sensible Farmer 209 (en haut) et pour l'essai Aubergine 2012 cycle 1 sur les 3 microparcelles de la variété sensible E8 (en bas).

Tableau 4. Distribution des fréquences d'allèles nuls dans les 99 haplotypes observés dans les collections CORETEP 2009, tomate sensible 2012 et aubergine cycle 1 2012.

Nombre d'allèles nuls (sur 13 loci)	Nombre d'haplotype	Effectifs dans les collections			Total
		CORETEP 2009	Tomate 2012	Aubergine CYCLE1	
0	3	0	197	54	251
1	19	24	72	31	127
2	17	9	16	14	39
3	18	95	28	23	146
4	15	17	15	3	35
5	10	8	3	3	14
6	8	20	14	1	35
7	4	1	2	1	4
8	1	2	0	0	2
9	2	1	2	0	3
11	2	13	0	0	13
Total général	99	190	349	130	669

I. Cinétique d'apparition des symptômes - Variabilité spatiale

Afin d'étudier la cinétique d'apparition des symptômes de flétrissement et leur variabilité spatiale, un suivi hebdomadaire de l'incidence de maladie a été réalisé sur les plants de tomate et sur les plants d'aubergine.

Au cours de la phase 1 (sur tomate sensible), on observe une évolution constante des symptômes (**figure 12**). On observe le 15 mars 2012 des foyers d'apparition de la maladie aux plantes O27, O43, R16, R17 et P35 et P45 avec six plantes infectées. Puis les symptômes de nouveaux foyers apparaissent aux plantes E29/E34/E35/E37, C04/C05-D03/D04 et C65/C68-C69. La semaine suivante, 15 nouveaux plants sont infectés puis 33 le 5 avril 2012 et finalement 54 sont infectés au 11 avril 2012. Parallèlement, on observe que les plantes voisines d'une plante infectée s'infectent à leur tour. Ainsi, les plantes R16 et R17 sont infectées le 15 mars 2012 ; une semaine plus tard, les plantes R18, R19, R21 et R23 présentent du flétrissement à leur tour. La diffusion se poursuit la semaine suivante avec le flétrissement des plantes R14, Q16, Q17 et Q18, puis finalement la plante Q19 sept jours après. Le même phénomène est observé pour les autres foyers d'infections précédemment mentionnés (**annexes 5**).

Dans la phase 2 de l'essai (cycle 1 de culture d'aubergine), les seuls symptômes observés ont été sur E8 (aubergine sensible) (**figure 12**). Aucun symptôme n'a été observé sur la variété E6, mais les isollements pratiqués en fin de cycle ont permis d'identifier des infections latentes de *R. solanacearum* sur certains plants. Les symptômes ont commencé à apparaître sur E8 une semaine après plantation sur neuf plantes. On observe ensuite l'apparition de nouveaux foyers dans les micro-parcelles, par exemple sur les plantes M29/M32. Ces foyers s'agrandissent et infectent les plantes avoisinantes. Par exemple, le 26 avril 2012, les plantes Q22 et Q23 sont infectées. Ensuite, les plantes R22 et R23 puis Q22 et R20 deviennent infectées. Finalement, les plantes Q24, Q25, R24 et R25 sont aussi infectées. A la fin des trois mois de culture, 51 plantes (soit 32,7 % d'incidence sur les trois micro-parcelles d'E8) présentent les symptômes du flétrissement bactérien (**annexe 6**).

II. Echantillonnage et identification des souches bactériennes.

Au cours de la phase 1, 48 prélèvements ont été réalisés pour le premier double W (plan 1A): 8 prélèvements de sol, 20 prélèvements de rhizosphère et 20 prélèvements de tige (tige et

rhizosphère étant extraites sur la même plante). Ensuite, 26 prélèvements de tige ou de sol ont été réalisés par micro-parcelles. Sur un total de 206 échantillons prélevés sur sol ou sur plant de tomate, 709 colonies morphologiquement semblables à *R. solanacearum* ont été sélectionnées puis identifiées par PCR multiplexe. De cette collection, seulement 49,8 %, soit 349 souches ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *R. solanacearum*, classées dans le phylotype I. Sur ces 349 souches, 98 ont été extraites du compartiment sol et 251 souches ont été extraites du compartiment tige. Curieusement, aucune des souches extraites de la rhizosphère ne s'est révélée être du *R. solanacearum*. Dans la suite de cette étude, les souches issues d'un même compartiment (sol, tige ou rhizosphère) seront considérées a priori comme une population à part entière. Ainsi, les 349 sont réparties en 19 populations comprenant de 8 à 30 individus, identifiées d'après leur position sur la parcelle (lettre correspondant à la ligne et numéro de plante) : 6 populations étant issues du sol (S), et 13 populations étant issues de tige (T).

Au cours de la phase 2 (cycle 1 de culture d'aubergine), 195 prélèvements de tige et 195 prélèvements de rhizosphère ont été réalisés, permettant d'extraire 1347 souches morphologiquement semblables à *R. solanacearum*. Seule une petite partie a pu être typée jusqu'au bout compte tenu des contraintes de période du stage. Afin de pouvoir mener une analyse préliminaire de l'effet de la variété sur les populations bactériennes à l'issue de ce premier cycle de culture, nous avons choisi un couple de populations rhizosphère/tige par micro-parcelle d'au moins 10 souches chacune. Ainsi, 131 isolats sur ces 1347 souches ont été sélectionnés, répartis en 6 populations : un couple rhizosphère/tige provenant de la variété résistante E6, et deux couples rhizosphère/tige provenant de la variété sensible E8. Toutes ces souches ont été identifiées comme *R. solanacearum* phylotype I.

III. Diversité haplotypique et génétique

Sur les 13 loci VNTRs développés au sein de l'équipe, un seul présente du polymorphisme (CMR0985) dans les trois jeux de données issus de l'essai CORE-TEP 2009, l'essai tomate 2012, et de l'essai aubergine cycle 1 2012. Les 99 haplotypes (**annexe 7**) déterminés contiennent entre 0 et 84,62 % (onze loci) d'allèles nuls, mais les haplotypes les plus fréquents n'en contiennent pas plus de trois (23,02 %). Dans notre analyse, 73 données de F_{st} sont manquantes, aussi avons-nous basé notre analyse sur les tests exacts de Raymond et Rousset (1995) qui se basent sur la fréquence des haplotypes. Nous avons ainsi décidé de

Tableau 5. Statistiques de base sur les populations échantillonnées sur tomate 2012 ; ^a : Populations définies selon le compartiment d'échantillonnage (S = sol; T = tige) et la localisation sur la parcelle ; ^b : Loci présentant au plus 5% de données manquantes (allèles nuls).

Populations ^a	Nombre d'individus	Nombre de loci			H _E de Nei (locus CMR0985)	Nombre d'allèles au locus CMR0985
		total	utilisables ^b	polymorphes		
SM28	10	13	6	0	0	1
SM37	26	13	12	1	0,08	2
SP17	8	13	11	0	0	1
SP27	19	13	2	0	0	1
SP45	20	13	6	0	0	1
SR16	16	13	7	0	0	1
TD03	30	13	9	0	0	1
TD05	23	13	10	0	0	1
TD06	17	13	4	0	0	1
TK36	18	13	8	1	0,11111	2
TM29	16	13	10	0	0	1
TM32	21	13	8	0	0,45614	2
TN54	29	13	11	0	0	1
TO44	17	13	5	0	0	1
TP37	17	13	7	0	0	1
TP45	7	13	11	0	0	1
TQ42	12	13	11	0	0	1
TR16	23	13	7	0	0	1
TR22	20	13	9	0	0	1
Moyenne	18,368	13	8,105	0,105	0,03407	1,158
ecart-type	6,353	0	2,726	0,315	0,10666	0,375
Total	349	13	NA	1	0,49653	3

Tableau 6. Statistiques de base sur les populations isolées de l'essai CORETEP 2009 ; ^a : Populations isolées sur aubergine (E) et tomate (T), sensibles (S) ou résistantes (R) ; ^b : Loci présentant au plus 5% de données manquantes (allèles nuls) ; ^c Sur loci M786 et CMR0985.

Population ^a	Nb individus	Nombre de loci	Nbre de loci		H _E de Nei	Nombre d'allèles
			utilisables ^b	polymorphes		
RD13	30	13	9	0	0	1
RM37	29	13	7	0	0	1
RO39	10	13	10	0	0	1
TD13	30	13	7	0	0	1
TM37	21	13	8	0	0	1
TO39	10	13	13	0	0	1
Moyenne	21,667	13	9	0	0	1
Ecart-type	9,647	0	2,28	0	0	0

Tableau 7. Statistiques de base sur les populations échantillonnées sur aubergine (cycle 1 2012) ; ^a : Populations définies selon le compartiment d'échantillonnage (R = rhizosphère; T = tige) et la localisation sur la parcelle ; ^b : Loci présentant au plus 5% de données manquantes (allèles nuls).

POPULATIONS ^a	Nb individus	Nbre de loci		H _E de Nei ^c	Nombre d'allèles au locus CMR0985
		utilisables ^b	Polymorphes		
E10 (S)	45	8	0	0	1
E5 (R)	20	7	0	0	1
E6 (R)	3	1	0	0	1
E7 (R)	5	5	0	0	1
E8 (S)	50	6	1	0,37755	2
T1 (R)	5	10	0	0	1
T10 (S)	39	6	1	0,53333	2
T3 (R)	14	5	1	0,51282	2
Moyenne	22,625	6	0,125		1,375
Ecart-type	19,294	2,619	0,354		0,51754917
TOTAL				0,07489	

faire nos analyses, en particulier sous ARLEQUIN, sous deux configurations : les allèles nuls sont considérés comme données manquantes ($0=NA$), ou les allèles nuls sont considérés comme des allèles ($0 = 1$). Le nombre de répétitions de motifs VNTR est compris entre 1 (M0786) et 19 (CM0985) (**tableau 4**). La comparaison du nombre d'allèles a été réalisée avec des estimateurs non biaisés.

Dans l'essai tomate 2012, 49 haplotypes, nommés H01 à H49 (22 haplotypes de plusieurs individus et 27 singletons) ont été identifiés. Dans l'essai aubergine 2012, 26 haplotypes (14 haplotypes et douze singletons) sont identifiés, dont 7 (H05, 07, 13, 22, 34, 49) sont communs avec l'essai tomate. Dans l'essai CORETEP 2009, 33 haplotypes originaux (18 haplotypes et 15 singletons) sont observés (**figure 1, annexe 8**). La diversité génétique (H_E de Nei, **tableau 5**) sur l'essai tomate 2012 n'a pu être calculée que pour le marqueur CMR0985 et dans trois populations : la population 2 (SM37), la population 10 (TK36) et la population 12 (SM32). En considérant que $0 = NA$, H_E est la plus forte (0,4516) dans la population TM32, alors que le H_E est beaucoup plus basse dans TK36 (0,111) et SM37 (0,08). En considérant que $0 = 1$ allèle, les fréquences alléliques dans les 19 populations varient entre 0,03 et 0,22. La richesse allélique de la population SM37 est de 1,071, de 1,108 pour la population TK36 et de 1,444 pour la population TM32. Pour les populations issues de la CORETEP (**tableau 6**) on observe, sous l'hypothèse $0 = NA$, une diversité allélique de 0,378 pour la variété E8, de 0,533 pour la variété T10 et de 0,513 pour la variété T3. Lorsque les 0 sont pris en compte, la diversité allélique varie entre 0,08 et 0,45. Dans les populations issues du cycle 1 de la culture d'aubergine (**tableau 7**), les diversités H_E sont nulles lorsque les 0 sont considérés comme des NA mais varient entre 0,00 et 0,21 lorsque 0 est considéré comme un allèle.

IV. Structuration d'une population parcellaire de *R. solanacearum*

Cette étude a été menée sur l'essai tomate 2012. Nous avons notamment évalué la structuration de la diversité selon les axes vertical (par groupe de n° de plants) et horizontal (par billon) par rapport à la **figure 7**.

4.1 Structuration spatiale sur l'essai tomate

Une analyse de variance moléculaire sur les billons d'origine (**tableaux 8**) a été réalisée afin de savoir s'il y a un gradient de diversité horizontale. D'après le tableau d'AMOVA

Tableau 8. Regroupement des populations selon le billon d'origine (gradient de diversité horizontal) issues de l'essai tomate 2012

Groupes	Populations
Billon 2 (C-D)	TD05,TD03,TD06
Billon 6 (K-L)	TK36
Billon 7 (M-N)	SM28,SM37,TM29, TM32,TN54,
Billon 8 (O-P)	TP37,TO44,SP27,S P17
Billon 9 (Q-R)	TR22,TQ42,TP45,S P45,SR16,TR16

Tableau 9. Analyse de la variance moléculaire (AMOVA) basée sur le regroupement des populations (tableau 8) issues de l'essai tomate 2012 (sur locus CMR0985).

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Composants de la variance	Taux de variation (%)	Significativité
Entre billons	4	20.258	0.01071	4.05032	NS
Entre populations sur un billon	14	50.694	0.23321	88.16852	***
Dans les populations	330	6.01	0.02058	7.78116	***
Total	348	76.961	0.2645		

Tableau 10. Regroupement selon le n° de plant (gradient de diversité vertical) des populations issues de l'essai tomate 2012.

Groupes	Populations
PLANTS 1-10	TD03,TD05,TD06
PLANTS 21-30	SP27,TR22,TM29, SM28
PLANTS 31-40	TP37,TK36,SM37, TM32
PLANTS 41-50	TP45,TQ42,SP45, TO44
PLANTS 50-60	TN54
PLANTS 11-20	SP17,SR16,TR16

Tableau 11. Analyse de la variance moléculaire (AMOVA) entre groupes plantes, entre populations d'un même groupe-plante (tableau 10) des populations des issues de l'essai tomate 2012 (sur locus CMR0985).

Source de variation	Somme des carrés	Composants de la variance	Taux de variation (%)	Significativité
Entre groupes plantes	55.299	0.18516	64.74794	*
Entre les populations dans les groupes	15.653	0.08023	28.0552	***
Dans les populations	6.01	0.02058	7.19686	***
Total	76.961	0.28597		

Tableau 12. Matrice de significativité des tests de différenciation entre groupe des populations issues de l'essai tomate 2012 de Raymond et Rousset (1995), basé sur les fréquences d'haplotype.

GROUPES	D03,5,6	M28,29-P27-R22	K36-M32,37-P37	O44-P45-Q42	N54
M28,29-P27-R22	+				
K36-M32,37-P37	+	+			
O44-P45-Q42	+	+	+		
N54	+	+	-	+	
R16, P17	+	-	+	+	+

(**tableau 9**), le billon n'est pas un facteur structurant, la variabilité se situant essentiellement entre les populations au sein des billons (88,1685 %***) ou au sein même des populations (7,78116 %***).

Afin de tester la distribution de diversité le long des lignes (gradient de diversité vertical), les populations ont été regroupées en plusieurs groupes de numéro de plante, en fonction de leur localisation en ligne (**tableau 10**). L'AMOVA sur ces groupes (**tableau 11**) montre que la variation se distribue principalement entre les groupes (64,74794 %), de façon significative. Le test exact de différenciation de Raymond et Rousset (**tableau 12**) indique des différenciations non significatives entre groupes Plants 11-20 et Plants 21-30, ainsi qu'entre Plants 31-40 et N54. Ces résultats suggèrent que la variabilité se structure donc davantage verticalement qu'horizontalement.

Si les populations sont généralement significativement différenciées entre elles (**tableau 13**), on observe des populations non différenciées les unes des autres, telles sur les lignes Q et R, entre TQ42 et les populations SP17 et SP27.

4.1.1 Test de la structuration spatiale : Isolement par la distance (IBD).

L'isolement par la distance permet de savoir si il existe ou non une structuration spatiale de la diversité génétique de nos populations. La **figure 12** représente la corrélation linéaire entre la distance génétique et distance géographique. On observe que pour trois cent sept combinaisons cette corrélation n'a pas pu être calculée. Ces valeurs non calculables sont dues à un trop grand nombre de données manquantes. Ces données manquantes influencent l'orientation de la courbe de régression linéaire et ne montrent pas une corrélation distincte entre la distance génétique et la distance géographique.

En fait, les distances de F_{st} de Slatkin réellement exploitables ne sont disponibles que sur 42 couples de populations. Le calcul de corrélation ayant été mené sans succès sous IBDWS et GENPOP sur le Web, nous avons calculé la régression linéaire entre nos distances géographiques (IBD à une dimension) ou le Log (Distance) (IBD à deux dimensions) et la distance Slatkin (LinFST), sur les conseils de V. Ravigné (UMR BGPI). La régression linéaire, calculée sous R, nous a donné les résultats suivants :

IBD à deux dimensions : $\text{LinFST} = 6.291 \times \text{LogDIST} - 31.701$, $r^2 = 0.165$, $P\text{-value} = 0.0044^{**}$

IBD à une dimension : $\text{LinFST} = 0.0098 \times \text{DIST} + 1.459$, $r^2 = 0.1703$, $P\text{-value} = 0.0038^{**}$

Ces formules permettent de calculer un voisinage de 50.751 (intervalle de confiance : 30.595-148.709).

Tableau 13. Matrice de significativité des tests de différenciation entre populations de tomate sensible (Raymond et Rousset, 1995), basé sur les fréquences d'haplotypes.

	SM28	SM37	SP17	SP27	SP45	SR16	TD03	TD05	TD06	TK36	TM29	TM32	TN54	TO44	TP37	TP45	TQ42	TR16
SM37	+																	
SP17	-	+																
SP27	-	+	-															
SP45	+	+	+	+														
SR16	-	+	-	-	+													
TD03	-	+	-	+	+	-												
TD05	-	+	-	+	+	-	-											
TD06	+	+	+	+	+	+	+	+										
TK36	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
TM29	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+								
TM32	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-							
TN54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
TO44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
TP37	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
TP45	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-			
TQ42	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+		
TR16	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
TR22	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

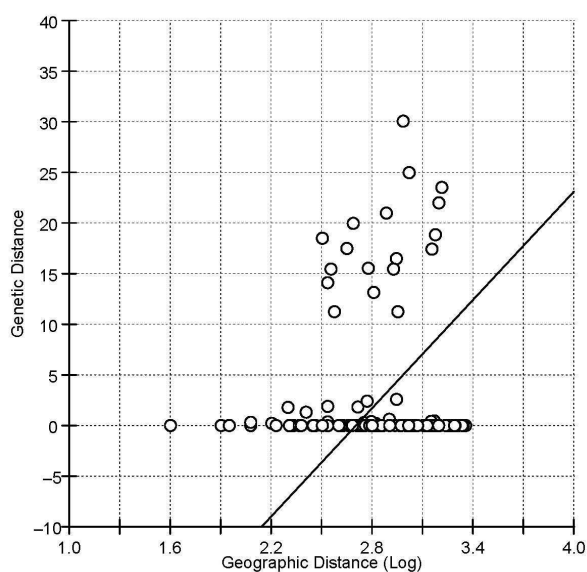


Figure 13. Régression linéaire de la corrélation entre la distance génétique ($F_{st}/1-F_{st}$) et le log de la distance géographique des populations extraites de l'essai tomate 2012. La corrélation a été réalisée grâce au site web IBDWS (IBD Web Site).

Tableau 14. Regroupement des populations par le compartiment de piégeage des populations issues de l'essai tomate 2012.

GROUPES	POPULATIONS
SOL	SM28, SM37, SP17, SP27, SP45, SR16
TIGE	TD03, TD05, TD06, TK36, TM29, TM32, TN54, TO44, TP37, TP45, TQ42, TR16, TR22

Tableau 15. Analyse de la variance moléculaire (AMOVA) entre compartiments (sol/plante, tableau 14) et entre populations issues de l'essai tomate 2012.

Source de variation	Somme des carrés	Composants de la variance	Taux de variation (%)	Significativité
Entre compartiments	0.186	-0.03508	-14.44172	NS
Entre les populations dans les compartiments	70.766	0.2574	105.96872	***
Dans les populations	6.01	0.02058	8.473	***
Total	76.961	0.2429		

4.1.2 Structuration selon le compartiment d'isolement (sol/tige)

Deux couples sol/tiges ont été identifiés dans la population de tomate sensible: SP45/TP45 et TR16/SR16. Le test exact de différenciation de Raymond et Roussel (**tableau 13**) montre qu'il n'y a pas de différenciation significative entre les compartiments d'une même plante au seuil de 5 %, que ce soit pour la plante P45 ($p = 0.1958$) ou pour la plante R16 ($p = 0.40244$).

D'après l'AMOVA (**tableau 15**) calculée en regroupant les populations de sol et les populations de plantes (**tableau 14**), le facteur « compartiment d'isolement » n'est absolument pas structurant (-14.441 %, NS) ; la variabilité se distribue essentiellement entre les populations au sein de chaque compartiment (105.96872 %) ou au sein même des populations (8,473 %).

4.1.3 Réseaux d'haplotypes sur l'essai tomate 2012

La **figure 14**, construite en utilisant la distance de Manhattan, représente les réseaux d'haplotypes des échantillons issus de l'essai tomate 2012. Les haplotypes identifiés se répartissent en trois complexes clonaux (CC), dont un majeur regroupant la majeure partie des individus et deux mineurs. L'un des deux CC mineurs (en haut) est majoritairement composé d'individus issus de tige alors que le second CC mineur est composé d'individus de sol et de tige de façon équivalente. Aucune distinction n'est vraiment observable entre les populations de tige et les populations de sol même si on observe un groupe constitué de SP45 qui commence à se détacher du CC majeur. De même, on ne distingue pas de complexe clonal confiné à une zone particulière de la parcelle.

4.1.4 Variation du déséquilibre de liaison selon la localisation et le compartiment d'isolement

Parmi les populations issues de l'essai tomate 2012 (**tableau 16**), les populations TD06, SM28, TM29, TO44, SP27, TP37, SP45, et TR22 sont en déséquilibre de liaison (DL) hautement significatif avec un $r\text{BarD}$ compris entre 0.714594 et 0.104028 et les populations TD03, TD05 et TR16 sont aussi en DL de manière assez significatif avec un $r\text{BarD}$ compris entre 0.160994 et 0.200159. Les populations TK36, SM37, TN54, SP17, TP45, TQ42 et SR16 semblent par contre être recombinantes. Sur la plante P45, il y a un DL hautement significatif

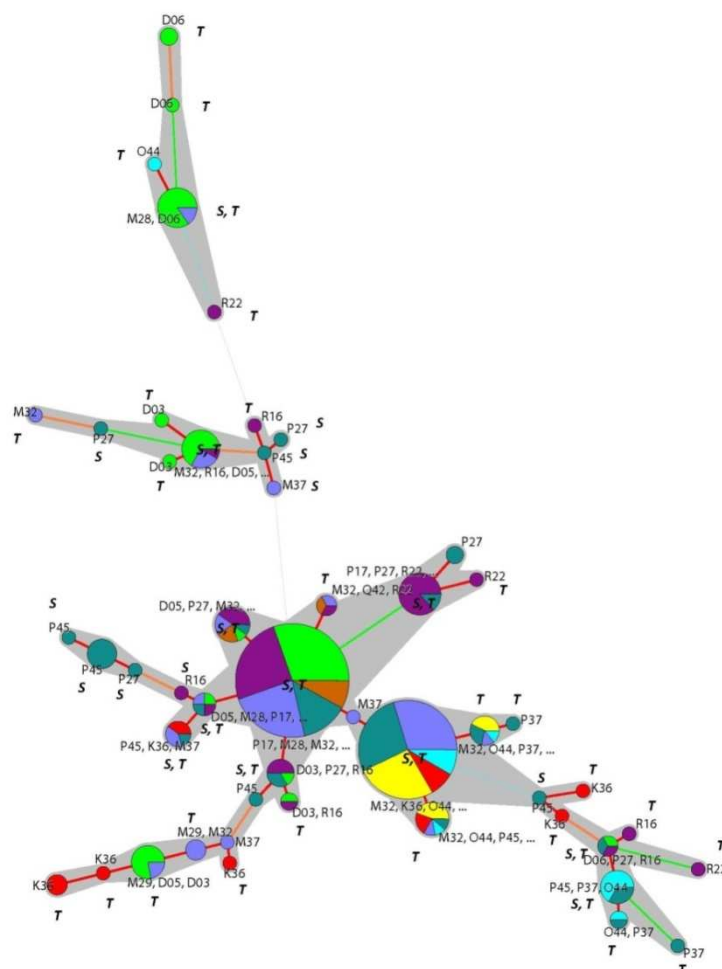


Figure 14. Réseau d'haplotypes (« Minimum Spanning Tree ») généré avec le logiciel BioNumerics après calcul des distances de Manhattan. Chaque couleur correspond à une des 19 populations bactériennes de *R. solanacearum*. Les camemberts représentent les différents haplotypes et les groupes grisés représentent les complexes clonaux.

Tableau 16. Estimateurs de déséquilibre de liaison sur les populations échantillonnées sur tomate en 2012 ; ^b Nombre d'haplotypes observés ; ^c Proportion de paires de loci compatibles ; ^d Les P-values sont obtenues après comparaison des données observées avec celles de 1000 jeux de données artificiellement recombinaées. ^{NS}: non-significatif ; * : significatif ; ** : hautement significatif ; *** : très hautement significatif ; ^e I_A et rBarD sont deux expressions de l'indice d'Association (Burt et al 1996).

POPULATION ^a	n	g_{obs} ^b	PrCompat ^c	P^d	I_A^e	rBarD ^e	P^d
D03T	30	7	0.961538	0.303 ^{NS}	1.17015	0.314488	< 0.001***
D05T	23	5	1	0.344 ^{NS}	0.760609	0.200159	0.003**
D06T	17	5	1	0.011*	1.26492	0.160994	0.002**
K36T	18	8	0.935897	0.944^{NS}	0.202732	0.0423874	0.141^{NS}
M28S	10	3	1	0.002**	4.27027	0.714594	< 0.001***
M29T	16	4	1	0.1 ^{NS}	1.06187	0.534501	< 0.001***
M32T	21	9	0.974359	0.013*	1.23742	0.185667	0.001***
M37S	26	5	1	1^{NS}	0.200765	0.0687926	0.095^{NS}
N54T	29	3	1	0.612^{NS}	-0.104229	-0.104647	1^{NS}
O44T	17	6	0.961538	0.128 ^{NS}	1.80651	0.270566	< 0.001***
P17S	8	3	1	1^{NS}	-0.142857	-0.142857	1^{NS}
P27S	19	9	0.948718	0.879 ^{NS}	0.992824	0.104028	0.001**
P37T	17	6	0.974359	0.137 ^{NS}	1.72477	0.358307	< 0.001***
P45S	20	8	0.935897	< 0.001***	1.74613	0.227095	< 0.001***
P45T	7	6	0.974359	0.891^{NS}	-0.0923335	-0.0467497	0.745^{NS}
Q42T	12	3	1	1^{NS}	-0.11541	-0.117954	1^{NS}
R16S	16	7	0.987179	0.893^{NS}	0.467839	0.0952545	0.074^{NS}
R16T	23	8	0.935897	0.456 ^{NS}	0.781609	0.13406	0.004**
R22T	20	7	0.974359	0.5 ^{NS}	1.33126	0.173973	< 0.001***

pour la population de sol et un DL non significatif pour la population de tige. Curieusement, pour les populations issues de R16, on observe une tendance inverse : recombinaison dans le sol et DL significatif dans la tige. L'effectif de la population TP45 étant de 7 individus, les résultats du DL sont sujets à caution. L'effet du compartiment d'isolement sur le niveau de DL n'est pas statistiquement détectable (test χ^2 , $P = 0.4192$).

4.2 Effet de l'aubergine sur la diversité et structuration génétiques des populations : Essai Aubergine 2012

Tout d'abord nous avons observé que 7 haplotypes isolés sur tomate sont également retrouvés sur aubergine. Mais 19 nouveaux haplotype sont apparus sur aubergine. Cependant l'effet le plus net est une diminution de la diversité génétique entre les populations bactériennes issues de tomate et d'aubergine. Les populations isolées sur la variété résistante E6 sont même quasiment monomorphes (deux haplotypes dans la rhizosphère, un seul dans la tige). Pour les six populations issues du premier cycle de culture d'aubergine (**tableau 17**), l'analyse moléculaire de la variance (**tableau 18**) relève que la totalité de la variation génétique (100 %) se situe entre les six populations et non au sein même de ces populations. On observe qu'il n'y a pas de différenciation significative entre les populations isolées d'E6 (RO39, TO39) et TM37 (**tableau 19**). En comparant la population de rhizosphère et la population de tige, on constate des différences significatives entre couples de populations isolées de E8 (RD13/TD13, RM37/TM37), mais pas sur E6 (RO39/TO39) (**annexe 9**). Pour autant, l'AMOVA menée sur les populations isolées de E8 montre que l'effet du compartiment n'est pas structurant : la variation est essentiellement entre les populations au sein des groupes (groupe 1 : RD13/RM37 et groupe 2 : TD13/TM37) (76.97%) et non entre les groupes rhizosphère vs. tige (variation de -5.2%) (**annexe 9 bis**).

4.2.1 Effet sur le déséquilibre de liaison

Au sein des populations issues de l'essai aubergine 2012 cycle 1 (**tableau 20**), on observe que les indices d'association r_{BarD} et I_a sont plus forts que pour les populations issues des autres essais. En effet, l' I_a est compris entre 0.823861 et 2 et le r_{BarD} entre 1 et 0.12155. Cinq populations sont en déséquilibre de liaison hautement significatif (TM37, RM37, RD13, TD13) voire moyennement significatif (RO39) et pour une population (TO39) les indices d'associations ne sont pas calculables. Contrairement aux populations issues de l'essai tomate

Tableau 17. Regroupement en fonction de la plante piège (allèles nuls = données manquantes) des populations issues de l'essai aubergine 2012.

GROUPE	POPULATIONS
D13, aubergine E8 (S)	RD13, TD13
M37, Aubergine E8 (S)	RM37, TM37
O39, Aubergine E6 (R)	RO39, TO39

Tableau 18. Analyse de variance moléculaire entre les populations issues des espèces d'aubergines résistantes (E6) et sensible (E8).

Source de variation	Somme des carrés	Part dans la variation totale	Pourcentage de la variation	Significativité
Entre localisations	27.857	0.4001	100	***
Entre les populations dans les localisations	0	0	0	NS
Dans les populations	0	0	0	NS
Total	27.857	0.4001		

Tableau 19. Test exact de Raymond et Rousset (1995) sur fréquences haplotypiques des populations isolées d'E8 (D13, M37) et E6 (O39).

	RD13 (E8)	RM37 (E8)	RO39 (E6)	TD13 (E8)	TM37 (E8)
RM37 (E8)	+				
RO39 (E6)	+	+			
TD13 (E8)	+	+	+		
TM37 (E8)	+	+	-	+	
TO39 (E6)	+	+	-	+	-

Tableau 20. Estimateurs de déséquilibre de liaison sur les populations échantillonnées sur aubergine en 2012 ; ^b Nombre d'haplotypes observés ; ^c Proportion de paires de loci compatibles ; ^d Les P-values sont obtenues après comparaison des données observées avec celles de 1000 jeux de données artificiellement recombinaisons. ^{NS}: non-significatif ; * : significatif ; ** : hautement significatif ; *** : très hautement significatif ; ^e IA et rBarD sont deux expressions de l'indice d'Association (Burt et al 1996).

POPULATION		n	g_{obs}^b	PrCompat ^c	P^d	I_A^e	rBarD ^e	P^d
E6 [R]	O39R	10	2	1	1 ^{NS}	2	1	0.009**
	O39T	10	1	1	1 ^{NS}	NA	NA	< 0.001***
E8 (S)	M37R	29	9	0.884615	0.982 ^{NS}	1.01545	0.121554	< 0.001***
	M37T	21	7	0.923077	0.362 ^{NS}	1.90575	0.169187	< 0.001***
	D13R	30	11	0.948718	0.012*	0.823861	0.152823	< 0.001***
	D13T	30	10	0.884615	0.001**	1.02701	0.206062	< 0.001***

Tableau 21. Regroupement entre les variétés des populations issues de l'essai CORETEP 2009.

GROUPE	POPULATION
E8	E8, bloc2 et 3
E6	E6 bl2
E7	E7 bl3
T1-T6	T1 & T3 bl2 et 3
T10	T10 Bl3

Tableau 22. Test exact de Raymond et Rousset (1995) sur fréquences haplotypiques des populations isolées de l'essai CORETEP 2009.

	E8	E6	E7	T1-T3
E6	-			
E7	-	+		
T1-T3	+	+	+	
T10	+	+	+	-

Tableau 23. Analyse de variance moléculaire entre variétés (tableau 21) de l'essai CORETEP 2009.

Source de variation	Somme des carrés	Part dans la variation totale	Pourcentage de la variation	Significativité
Entre variété	2.481	0.06256	30.57	**
Dans les populations	5.257	0.14208	69.43	
Total	7.738	0.20465		

2012, il n'y a pas de différence entre les déséquilibres de liaison des populations rhizosphère et tige d'une même plante. On observe cependant des valeurs de PrCompat (estimateur de la différence entre le DL observé et le DL généré aléatoirement après mille permutations) non significatives pour toutes les populations.

4.3 Essai CORETEP 2009 : Effet de l'espèce d'isolement et de la résistance variétale sur le niveau et la distribution de la diversité génétique de *R. solanacearum*

4.3.1 Effet de l'espèce et de la variété sur la distribution de la diversité génétique de *R. solanacearum*

Les H_E les plus élevées sont observées sur tomate (T10, T3) et l'aubergine sensible E8 (**tableau 2**). Le test exact de Raymond et Rousset montre qu'il y a une différenciation significative entre les populations issues des variétés d'aubergine résistante (E6 et E7) et sensible (E8) et qu'il en est de mêmes sur tomate entre les variétés résistantes (T3 et T1) et la variété sensible (T10) (**tableaux 21 et 22**). L'AMOVA réalisée sur cette population (**tableau 23**) montre qu'il y a une variabilité importante dans les populations issues de différentes variétés (69.45%) et que la variation entre les populations des variétés est significative.

4.3.2 Effet de l'espèce et de la variété sur le niveau de déséquilibre de liaison des populations de *R. solanacearum*

Pour les populations issues de la CORETEP 2009 (**tableau 24**), on observe que le rBarD est le plus fort dans le bloc 2 (0.48) puis dans le bloc 1 (0.13) et finalement dans le bloc 3 (0.07). Les populations bactériennes prisent bloc par bloc sont en déséquilibres de liaison hautement significatifs. En regardant les populations bactériennes isolées de tomate et aubergine, on se rend compte qu'elles sont aussi en DL hautement significatif avec un rBarD plus faible chez la tomate (1.18973) que chez l'aubergine (2.0325) même si les PrCompat sont non significatifs. Concernant les variétés sensibles d'aubergine, les populations de *R. solanacearum* issues de E8 sont en DL significatif, aussi bien dans la population entière (0.122174 avec p-valeur très significative) ou dans les blocs (bloc 1 = 0.179719*** et blocs 2 et 3 = 0.109171***). Cependant, pour les populations du bloc 1 et des blocs 2 et 3, on observe que le PrCompat est non significativement différent des jeux de données recombinaisons

Tableau 24. Estimateurs de déséquilibre de liaison sur les populations échantillonnées sur CORETEP en 2009 ; ^b Nombre d'haplotypes observés ; ^c Proportion de paires de loci compatibles ; ^d Les P-values sont obtenues après comparaison des données observées avec celles de 1000 jeux de données artificiellement recombinaées. ^{NS}: non-significatif; * : significatif; ** : hautement significatif; *** : très hautement significatif ; ^e I_a et rBarD sont deux expressions de l'indice d'Association (Burt et al 1996).

POPULATION	n	g _{obs} ^b	PrCompat ^c	P ^d	I _A ^e	rBarD ^e	P ^d
BLOC1	124	17	0.651515	0.567 ^{NS}	1.25096	0.130536	< 0.001***
BLOC2	13	8	0.818182	< 0.001***	4.78761	0.47922	< 0.001***
BLOC3	44	16	0.742424	< 0.001***	0.707263	0.0774318	< 0.001***
TOMATE	58	11	0.833333	0.161 ^{NS}	1.18973	0.147	< 0.001***
AUBERGINE	123	27	0.30303	0.135 ^{NS}	2.0325	0.190816	< 0.001***
E10 (S)	45	9	0.969697	0.283 ^{NS}	0.523445	0.0960926	0.012*
E8 (S)	50	17	0.727273	0.002**	1.12433	0.122174	< 0.001***
E5 [R]	20	10	0.954545	0.138^{NS}	0.101961	0.0180049	0.229^{NS}
E6 [R]	3	2	1	1^{NS}	1	1	0.342^{NS}
E7 [R]	5	2	1	1^{NS}	1	1	0.201^{NS}
T10 (S)	39	6	0.939394	0.023	1.67355	0.263045	< 0.001***
T3 [R]	14	6	1	0.029	0.594552	0.122674	0.018*

(respectivement 0.954545 et 0.83333). Ainsi, l'effet observé est bien dû à la variété et non à une interaction variété-bloc. Les populations de E10 sont aussi en DL significatif, mais plus faible ($r_{\text{BarD}} = 0.0969697$). Pour les variétés d'aubergine résistantes, l'effectif des populations de *R. solanacearum* issues des variétés E6 et E7 sont trop faibles pour pouvoir conclure. Cependant les populations issues de la variété E5 sont en DL non significatif ($p = 0.229$) ce qui laisse penser qu'il y a des événements de recombinaison au sein de cette population. Les populations issues des variétés de tomate sensible T10 sont en déséquilibre de liaison (0.263045) hautement significatif alors que les populations issues de tomate résistante T3 (0.122674) sont en DL mais faiblement significatif.

D. Discussion et perspectives

Le dispositif expérimental et les stratégies d'échantillonnage mises en œuvre durant ce stage ont permis d'isoler une très importante collection de *R. solanacearum*, sur plusieurs habitats (sol, rhizosphère, tige), plusieurs espèces végétales, et différents fonds génétiques d'une même espèce. Cette collection, encore incomplètement typée (10 % des mille trois cent quarante souches isolées du cycle 1), est un atout précieux qui pourra être exploité dans l'avenir par plusieurs stratégies d'analyse (séquençage complet, MLVA, MLSA-MLST) et pour répondre à plusieurs questions de recherche. La constitution de cette collection a cependant nécessité un très important et long travail de laboratoire ; dans le temps imparti, nous n'avons pas pu mener toutes les analyses planifiées au départ.

Toutes les souches identifiées comme *R. solanacearum* se sont avérées être d'un seul phylotype, le phylotype I, confirmant ainsi les travaux antérieurs (Poussier, 2000) ; (N'Guessan, thèse 2012, données non publiées).

I. Les marqueurs utilisés révèlent un faible polymorphisme dans les collections 2009 et 2012

Les statistiques de base (**tableaux 5, 6 et 7**) nous montrent un très faible polymorphisme des marqueurs utilisés sur les populations issues des essais 2012 mais aussi sur les populations issues de la CORETEP de 2009. Seul le marqueur CM0985 est polymorphe, présentant de la diversité allélique sur certaines populations, limitée à deux allèles. Les douze autres marqueurs présentent le même allèle partout. Ces résultats peuvent être expliqués soit par un trop faible pouvoir résolutif des marqueurs moléculaires utilisés, soit par une réelle absence de polymorphisme dans notre parcelle.

Le monomorphisme de marqueurs VNTR a déjà été observé notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* (Onteniente. L et al., 2003) où sur 201 marqueurs minisatellites, seulement huit se sont révélés polymorphes. Dans cette étude, le monomorphisme était expliqué par une plus grande stabilité des répétitions en tandem chez cette espèce bactérienne. La technique MLVA a été utilisée avec succès pour typer des épidémies à différentes échelles (Pourcel et al., 2007) (Vergnaud & Pourcel, 2006), y compris sur bactéries phytopathogènes à des échelles locales (Bui Thi Ngoc et al., 2009a) (Bui Thi Ngoc et al., 2009b) (Colleta-Filho & Machado, 2002). Dans le cas de *R. solanacearum*, les schémas MLVA développés dans l'équipe se sont avérés polymorphes sur des collections mondiales (trois cent trente-sept souches réparties dans les quatre phylotypes) mais aussi sur des populations phylotype I en

Côte d'Ivoire (N'Guessan et al., 2012, In prep.), ou sur des populations phylotype II en Guyane (P. Rivière, stage DUT 2012). À titre d'exemple, les diversités de Nei (H_E) observées en Côte d'Ivoire oscillaient entre 0.13 (locus M0786) et 0.80 (locus CM0985), avec cinq loci supérieur à 0.6 et cinq loci inférieure à 0.2. Il est possible que le faible polymorphisme observé dans notre étude soit dû à la taille des motifs VNTR (6 à 18 nucléotides, contre 5 à 9 nucléotides dans les études sur *X. citri* pv. *citri*) : le seul marqueur polymorphe dans notre analyse (CM0985) mesure en effet 6 nucléotides. Par ailleurs, la majorité de nos marqueurs sont localisés dans des gènes, donc potentiellement soumis à une pression de sélection purificatrice réduisant leur polymorphisme. Ce qui semble confirmer que la taille de nos marqueurs n'est pas adaptée à notre étude.

II. La diversité génétique de *R. solanacearum* observée à l'échelle parcellaire semble faible

La diversité génétique des souches étudiées reste malgré tout faible : entre 0,00 et 0,533 si l'on considère que les 0 sont des données non disponibles (NA). Pour autant, 99 haplotypes sont identifiés sur une collection de 670 souches. La comparaison des résultats CORETEP 2009 avec ceux obtenus par S. Poussier en 1999 est intéressante. Sur des effectifs très similaires d'isolats extraits de solanacées (193 en 1999, 190 dans cette étude), S. Poussier (thèse, 2000) identifie seulement 8 haplotypes AFLP alors que nous en identifions 33 par MLVA, ce qui prouve que notre population n'est pas complètement monomorphe, bien que les techniques utilisées aient un pouvoir de discrimination différentiel. La diversité parcellaire détectée par Grover et coll. (Grover et al., 2006) à l'aide de marqueurs RAPD est bien plus haute, mais la faible reproductibilité de la technique RAPD rend ces résultats peu fiables.

Une cause possible de cette faible diversité au sein des populations bactériennes extraites de la parcelle pourrait être due à l'absence de culture sensible durant les quatre dernières années, qui aurait pu avoir un effet de réduction quantitative (baisse du niveau d'inoculum) mais aussi qualitative (réduction du nombre d'haplotypes) de population. Cette absence de culture jouerait apparemment un effet de filtre sélectif sur la population parcellaire de *R. solanacearum*. Une autre explication à ce faible polymorphisme serait que les populations issues de sol ou de plante ne seraient qu'une petite fraction de la population totale. En effet, *R. solanacearum* est capable de survivre dans les habitats naturels (sol, eau) et dans la plante à l'état viable mais non cultivable (Grey & Steck, 2001). Il se pourrait donc que l'on n'ait ré-

isolé que les quelques haplotypes les plus aptes à se multiplier sur milieu gélosé.

III. Quelle dynamique spatiale de l'infection de *R. solanacearum* sur la parcelle ?

Le suivi épidémiologique de l'infection des tomates et des aubergines sensibles suggère fortement que la dissémination de la maladie s'effectue dans un premier temps en plusieurs foyers indépendants, qui diffusent de proche en proche au cours du temps. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de tester statistiquement cette hypothèse de diffusion plante à plante, en appliquant la démarche de Wimer et coll. (Wimer et al., 2011) sur tomate, ou encore en utilisant les méthodes de krigeage (Humeau et al., 2006).

Par ailleurs les données génétiques suggèrent aussi fortement une diffusion de génotypes bactériens de plante à plante, notamment le long des lignes. Les différentes AMOVA réalisées sur les populations de *R. solanacearum* isolées de tomate sensible ont montré que le gradient de diversité était essentiellement vertical (entre n° de plant, le long des lignes et billons donc) et non horizontal. Par ailleurs on observe que les populations voisines sur une ligne ne sont pas significativement différenciées les unes des autres (d'après les F_{st}) : ainsi sur les lignes M (positions 28, 29 et 32), R (16 et 22). Les données génétiques suggèrent en fait l'existence d'un foyer sur les lignes M à R et les n° de plante 16 à 32, et d'un deuxième foyer des lignes M à P sur les positions 37 à 45. L'analyse plus approfondie des populations isolées en fin de cycle 1 sur aubergine E8 (250 à 485 isolats par micro-parcelle) et E6 (entre 41 à 173 isolats par micro-parcelle) devrait nous permettre d'évaluer l'effet des différents fonds génétiques d'aubergine sur la dynamique d'infection (blocage des diffusions plante à plante ?).

La progression spatiale des foyers peut être modélisée (par exemple en représentant graphiquement l'augmentation de surface infectée en fonction du temps) pour identifier d'éventuels effets de diffusion de la maladie. Nous n'avons malheureusement pu mener à bien cette analyse dans le temps imparti au stage.

IV. La plante a un effet de filtre génétique sur les populations pathogènes de *R. solanacearum*

Sur tomate, les AMOVA et les tests de différenciation génétique ne permettent pas d'identifier clairement un éventuel effet-filtre. La différenciation entre populations de sol et

populations de tige n'est pas significative, les mêmes haplotypes se retrouvent dans les deux compartiments ; les valeurs de diversité génotypique se recoupent également (ex. : les indices G de Stoddard-Taylor sont de 3.06 ± 1.71 pour les populations tige, contre 2.52 ± 1.05 pour les populations de sol). En revanche, le niveau de déséquilibre de liaison est plus important dans les populations issues des tiges que dans les populations issues de sol, bien que le résultat de P45 soit contradictoire.

D'après les résultats CORETEP 2009, les populations de *R. solanacearum* isolées de variété sensible de tomate (T10) ne diffèrent pas significativement en fréquences haplotypiques des populations isolées de variété résistante (T1, T3). En revanche, les valeurs de déséquilibre de liaison sont hautes dans T10 et plus basses (bien que significatives) dans les populations T3, suggérant que le fonds génétique résistant induit des phénomènes de recombinaison dans la population bactérienne qui l'infecte.

En revanche l'aubergine sensible E8 (fin de cycle 1) semble clairement sélectionner les populations *R. solanacearum* : le nombre d'haplotypes infectant la tige est plus bas que celui montré dans la rhizosphère, sur D13 comme sur M37. D'autre part, les niveaux de déséquilibre de liaison sont plus importants dans les populations issues de la tige que dans celles issues de la rhizosphère.

V. Le fond génétique de l'espèce végétale d'isolement a un effet sur la structure des populations de *R. solanacearum*

Les données obtenues sur CORETEP 2009 font clairement apparaître une différenciation des populations entre aubergine et tomate, signe que chaque espèce semble sélectionner des haplotypes différents. L'effet du fonds génétique est aussi net : les populations isolées d'aubergine sensible (E10, E8) sont en DL significatif et très haut, tandis que les populations isolées d'aubergine résistante montrent un DL non significatif, indiquant donc un effet favorisant des résistances sur le niveau de recombinaison (E5 du moins ; les résultats sur E6 et E7 sont sujets à caution vu les faibles effectifs).

Mais c'est au niveau de l'essai 2012 que les effets sont les plus nets, avec notamment une forte réduction de la diversité sur la population d'aubergine 2012, particulièrement sur l'aubergine résistante E6. Sur O39 (20 individus/compartiment), on observe seulement deux haplotypes dans la population de rhizosphère, et un seul haplotype dans la population de tige, signe là aussi que E6 sélectionnerait d'une part au sein de la rhizosphère et d'autre part dans

la tige. Aucune différenciation génétique n'est détectée entre ces deux populations, peut-être à cause du trop faible niveau de diversité. Ainsi, la variété E6 ne flétrit pas à l'issue de ce premier cycle, mais est infectée de façon latente par un nombre très faible d'haplotypes (H17 et H22).

VI. Perspectives

A l'issue de cette étude, nous avons obtenu une collection importante de souches de *R. solanacearum* isolées de variétés sensibles et résistantes d'aubergine et de tomate. Cette étude a montré qu'il existait très peu de variabilité génétique au sein de notre collection d'échantillons et que cela était très certainement dû au caractère monomorphe de nos marqueurs moléculaires. Ainsi la prochaine étape à court terme sera de développer un nouveau jeu de marqueurs spécifique au phylotype I, à motifs courts. Les critères de choix possibles pour la sélection des marqueurs VNTR adaptés seront une taille de motifs entre 5 et 7 nucléotides, au moins 10 répétitions dans le génome d'origine, et localisés entre des gènes en évitant des zones d'auto-stop génétique (O. Pruvost, communication personnelle 2012). Le développement des nouveaux marqueurs VNTR sera possible grâce à la Plateforme UPSUD pour le criblage de la présence de motifs répétés en tandem (<http://minisatellites.u-psud.fr/GPMS/http://minisatellites.u-psud.fr/GPMS/>) (Denoeud. F & Vergnaud. G, 2004) (Grissa. I et al., 2008), ainsi qu'à l'utilisation du logiciel POLLOC (Rodríguez-R et al., 2011). Une fois ces marqueurs moléculaires développés, les souches de *R. solanacearum* issue du cycle 1 d'aubergine devront être génotypées et la diversité génétique analysée afin de confirmer les résultats obtenus lors de cette étude.

Afin d'éviter l'étape de culture sur boîte de Pétri et donc de perdre potentiellement des souches de *R. solanacearum* VNBC, une autre perspective, à moyen terme, sera de développer et/ou adapter des méthodes d'amplification de VNTR culture-indépendants, par exemple sur des extraits directs de sol, ou de plante.

Pour autant nous avons montré que des phénomènes de recombinaison pouvaient être détectés à l'échelle d'une parcelle, confirmant ainsi le fait que le phylotype I est un groupe recombinogène (Wicker et al., 2012). Nous avons aussi montré que les épidémies semblent progresser de proche en proche. Reste maintenant à savoir quels stades du cycle infectieux sont modifiés par la résistance d'E6 (gène *ERsI*) et si les isolats capables d'infecter E6 ont la même fitness que ceux isolés d'E8 (aubergine sensible).

Il est intéressant de constater que les deux cycles de culture, tomate et aubergine, ont augmenté les tailles de population, ce qui pourrait suggérer une augmentation de la diversité génotypique et allélique dans les prochains cycles de culture d'aubergine. Il est en effet prévu d'implanter au moins trois cycles de culture d'aubergine sensible et résistante afin de suivre l'évolution de cette population parcellaire de *R. solanacearum*. Cette étude permettra d'appréhender les facteurs contribuant à la dynamique évolutive sous pression de sélection ou non. Cette approche va permettre de mieux comprendre la dynamique évolutive de l'agent pathogène en réponse à la pression de sélection du gène *ERsI*, pour mettre au point des stratégies durables de déploiement de la résistance variétale, de manière globale et locale.

Bibliographie

- Agapow P-M, Burst A, 2000. MultiLocus 1.2 V. 1.2 PC-version. *Dept of Biology, Imperial College, Silwood Park- Ascot, Berks- UK*.
- Agapow P-M, Burt A, 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 101-2.
- Alvarez B, Vasse J, Courtois VL, Trigalet DD, Lopez MM, Trigalet A, 2008. Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* **98**, 59-68.
- Avrdc, 2003. AVRDC report 2002. In. Shanhua: Asian Vegetable Research and Development Center, 182.
- Avrdc, 2004. AVRDC report 2003. In. Shanhua: Asian Vegetable Research and Development Center, 194.
- Bertolla F, Frostegard A, Brito B, Nesme X, Simonet P, 1999. During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 467-72.
- Bois P, 2003. Hypermutable minisatellites, a human affair? . *Genomics*, 349–55.
- Brumbley S. M., Carney B. F., P. DT, 1993. Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology* **175**, 5477-87.
- Buddenhagen IW, Sequeira L, Kelman A, 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**, 726.
- Bui Thi Ngoc L, 2009. Apport de la génétique évolutive dans la taxonomie et l'épidémiologie de *Xanthomonas citri* pv. *citri*, bactérie responsable du chancre Asiatique des agrumes. In. Université de la Réunion : Saint-Denis, France.
- Bui Thi Ngoc L, Vernière C, Jarne P, *et al.*, 2009a. From Local Surveys to Global Surveillance: Three High-Throughput Genotyping Methods for Epidemiological Monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1173-84.
- Bui Thi Ngoc L, Verniere C, Vital K, *et al.*, 2009b. Development of fourteen minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri* *Molecular Ecology Resources*, 125-7.
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P, 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 110-21.
- Colleta-Filho H, Machado M, 2002 Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa*

populations from different Citrus sinensis varieties. *Applied and Environmental Microbiology*, 3731-6.

Cook D, Barlow E, Sequeira L, 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* : detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2**, 113-21.

Coupat-Goutaland B, Bernillon D, Guidot A, Prior P, Nesme X, Bertolla F, 2011. *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. *Molecular plant-microbe interactions* **24**, 497-505.

Deberdt P, Perrin B, Coranson-Beaudu R, Duyck P, Wicker E, 2012. Effect of Allium fistulosum Extract on *Ralstonia solanacearum* Populations and Tomato Bacterial Wilt. *Plant disease* **96**, 687-92.

Denny TP, 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam SS, ed. *Plant-associated bacteria*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 573-644.

Denoeud. F, Vergnaud. G, 2004. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. *BMC bioinformatics* **5**.

Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley SD, 2002. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the solanaceae. *Genetics* **161**, 1697-711.

Elphinstone JG, 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Saint Paul, MN, USA: APS Press, 9-28.

Estoup A, Angers B, 1998. *Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations*. IOS Press & Ohmsha.

Excoffier L, Lischer H, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 564-7.

Fegan M, Prior P, 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Madison: APS Press, 449-62.

Fegan M, Prior P, 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of bananas. *Australasian Plant Pathology* **35**, 93-101.

Gabriel DW, Allen C, Schell M, *et al.*, 2006. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant Microbe Interactions* **19**, 69-79.

Gillings MR, Fahy P, 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, United

Kingdom: CAB International, 95-112.

Grey B, Steck T, 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3866-72.

Grissa. I, Bouchon. P, Pourcel. C, Vergnaud. G, 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*, 660-8.

Grover A, Azmi W, Gadewar AV, *et al.*, 2006. Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 798-806.

Guidot A, Elbaz M, Carrère S, *et al.*, 2009. Specific Genes from the Potato Brown Rot Strains of *Ralstonia solanacearum* and Their Potential Use for Strain Detection. *Phytopathology* **99**, 1105-12.

Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrere S, Genin S, Boucher C, 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology* **189**, 377-87.

Hayward AC, 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* **27**, 265-77.

Hayward AC, 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 65-87.

Huising EJ, Coe R, Cares JE, *et al.*, 2008. Sampling strategy and design to evaluate below-ground biodiversity (Chapter 2). In: Moreira FMS, ed. *A handbook of tropical soil biology : sampling and characterization of below-ground biodiversity*.

Humeau L, Roumagnac P, Picard Y, *et al.*, 2006. Quantitative and molecular epidemiology of bacterial blight of onion in seed production fields. *Phytopathology*, 1345-54.

Imazaki I, Nakaho K, 2010. Pyruvate-amended modified SMSA medium: improved sensitivity for detection of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of general plant pathology* **76**, 52-61.

Janse JD, Schans J, 1998. Experiences with the diagnosis and epidemiology of bacterial brown rot (*Ralstonia solanacearum*) in The Netherlands. *Bulletin Oepp (Organisation Européenne et Méditerranéenne Pour la Protection des Plantes)* **28**, 65-7.

Johnson, 1984. A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 309-30.

Kalinowski S, 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 187-9.

Keim. P, Van Ert. M.N, Pearson. T, Vogler. A.J, Huynh. L.Y, Wagner. D.M, 2004. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect. Genet. Evol.* **4**, 205-13.

- Kelman A, 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* **44**, 693-5.
- Kelman A, Hartman GL, Hayward AC, 1994. *Introduction in : Bacterial wilt : the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. International, Wallingford, United Kingdom.
- Kelman A, Sequeira L, 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **55**, 304-9.
- Lebeau A, 2010. *Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à Ralstonia solanacearum : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine*. Saint Denis de la Réunion: Université de la Réunion, PhD PhD.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, *et al.*, 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* **101**, 154-65.
- Lebeau A, Gouy M, Daunay MC, *et al.*, 2012. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics* **accepted**.
- Levinson G, Gutman G, 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. . *Molecular Biology and Evolution*, 203-21.
- Li Z, Wu S, Bai X, *et al.*, 2011. Genome sequence of the tobacco bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **193**, 6088-9.
- Lin C-H, Hsu S-T, Tzeng K-C, Wang J-F, 2009. Detection of race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. *European journal of plant pathology* **124**, 75-85.
- Madden LV, Wheelis M, 2003. The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 155-76.
- Mc Donald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349-79.
- N'guessan A.C, Brisse. S, Poussier. S, Koné. D, E W, 2012, in prep. Development of minisatellite markers for molecular epidemiology of *Ralstonia solanacearum* Smith, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot.
- Nei. M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 3321-3.
- Oepp/Eppo, 2004a. Diagnostic protocols for regulated pests. *Ralstonia solanacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 173-8.
- Oepp/Eppo, 2004b. Normes OEPP - Systèmes de lutte nationaux réglementaires - PM9/3 *Ralstonia solanacearum* [EPPO Standards - National regulatory control systems - PM9/3

Ralstonia solanacearum]. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 327-9.

Onteniente. L, Brisse. S, Tassios. P.T, Vergnaud. G, 2003. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J Clin Microbiol*, 4991–7.

Opina N, Tavner F, Hollway G, *et al.*, 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **5**, 19-30.

Palloix A, Aymé V, Moury B, 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**, 190-9.

Peakall R, Smouse P, 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 288-95.

Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'arezzo. S, Vergnaud. G, Fry. Nk, 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 1190-9.

Poussier S, 2000. *Exploration de la diversité génétique de Ralstonia solanacearum, agent du flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs d'inoculum*. Rennes: Rennes IPhD thesis.

Poussier S, Thoquet P, Trigalet-Demery D, *et al.*, 2003. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology* **49**, 991-1003.

Poussier S, Trigalet-Demery D, Vandewalle P, Goffiner B, Luisetti J, Trigalet A, 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* **146**, 1679-92.

Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J, 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2184-94.

Pradhanang PM, 1999. Optimization of sampling method for accurate detection of *Ralstonia solanacearum* in naturally infested soil. *Bacterial Wilt Newsletter* **16**, 2.

R Development Core Team, 2010. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Remenant B, Babujee L, Lajus A, Medigue C, Prior P, Allen C, 2012. Sequencing of K60, Type Strain of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **194**, 2742-3.

Remenant B, Coupat-Goutaland B, Guidot A, *et al.*, 2010. Genomes of three tomato

pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* **11**, 1-16.

Remenant B, De Cambiaire JC, Cellier G, *et al.*, 2011. The genomes of the insect-transmitted plant pathogens *Ralstonia syzygii* and Blood Disease Bacterium reveal a recent evolutionary origin within the *R. solanacearum* species. *PLoS One* **6**, e24356.

Rodríguez-R L, Szurek B, Pourcel C, Koebnik R, 2011. *A new Perl toolkit for the detection and analysis of polymorphic loci and their application for bacterial typing.*

Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 1219–28.

Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, *et al.*, 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature (London)* **415**, 497-502.

Sola C, Horgen L, Maïsetti J, Devallois A, Seng Goh K, Rastogi N, 1998. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1122-4.

Tavares LA, Michereff SJ, Souza RMD, Mariano RDLR, 2000. Sampling plan for quantifying tomato bacterial wilt in the field. - Plano de amostragem para quantificacao da murcha bacteriana do tomateiro no campo. *Summa Phytopathologica* **26**, 306-10.

Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N, 1996. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 826-36.

Van Elsas JD, Smalla K, 1997. Methods for sampling soil microbes. In: Hurst CJ, Knudsen GR, Mc Inerney MJ, Stetzenbach CH, Walter MV, eds. *Manual of environmental microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 383-90.

Vasse J, Danoun S, Trigalet A, 2005. Microscopic studies of root infection in resistant tomato cultivar Hawaii7996. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. St Paul: APS Press, 285-91.

Vergnaud G, Pourcel C, 2006. *Multiple Locus VNTR (Variable number of tandem repeat) analysis*. Berlin: Stackebrandt, E.

Vos M, Didelot X, 2008. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 199-208.

Wallis FM, Truter SJ, 1978. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiological Plant Pathology* **13**, 307-10.

Wang J, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, Grimsley N, 2000. Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**, 6-13.

Wicker E, 2004. Lutte intégrée contre les maladies telluriques en cultures maraîchères. In.: PRAM, Cirad de Martinique.

Wicker E, Coranson-Beaudu R, Cadasse S, William MA, 2009. Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in the French West Indies raise new challenges to tomato breeders. *Acta Horticulturae*, 279-86.

Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, *et al.*, 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6790-801.

Wicker E, Lefeuvre P, Cambiaire JCD, Lemaire C, Poussier S, Prior P, 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME Journal* **6**, 961-74.

Wimer AF, Rideout SL, Freeman JH, 2011. Temporal and spatial distribution of tomato bacterial wilt on Virginia's eastern shore. *HortTechnology* **21**, 198-201.

Wright. S, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, 323-54.

Xu J, Zheng H, Liu L, *et al.*, 2011. Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Strain Po82. *Journal of Bacteriology* **193**, 4261-2.

Liste des annexes

- Annexe 1 : Milieux de mise en culture et tampons utilisés.
- Annexe 2 : Extraction d'ADN bactérien par le kit DNeasy (QIAGEN).
- Annexe 3 : Taille des amplifiats et nombre de répétitions correspondantes pour chaque couple d'amorces utilisées en typage moléculaire MLVA.
- Annexe 4 : Stript R pour le reformatage du tableau et l'ajustement des tailles d'allèle.
- Annexe 5 : Représentation graphique du suivi hebdomadaire (cinq dates) de la symptomatologie de l'infection des plants de tomate sensible (Famer 209) par le flétrissement bactérien.
- Annexe 6 : Représentation graphique du suivi hebdomadaire (10 dates) de la symptomatologie de l'infection des plants d'aubergine sensible et résistante (E8 et E6) par le flétrissement bactérien.
- Annexe 7 : Tableau récapitulatif du nombre d'haplotype ainsi que du nombre d'individus par haplotype identifié pour les populations issues de l'essai CORETEP 2009, du premier cycle de culture d'aubergine 2012 et de l'essai tomate sensible 2012.
- Annexe 8 : Distribution des 99 haplotypes observés dans les collections CORETEP 2009, Tomate 2012 et Aubergine 2012 cycle 1.
- Annexe 9 : Structuration de la diversité sur l'essai Aubergine 2012 cycle 1, entre les compartiments rhizosphère et tige des variétés E6 et E8 et analyse de variance moléculaire entre compartiments de l'essai Aubergine 2012 cycle 1.
- Annexe 9 bis : Structuration de la diversité sur l'essai Aubergine 2012 cycle 1, entre les compartiments d'une même variété et analyse de variance moléculaire entre variétés de l'essai Aubergine 2012 cycle 1.

Annexe 1 : Milieux de mise en culture et tampons utilisés

Préparation du milieu Kelman, pour 1 litre de milieu ((Kelman, 1954):

Ingrédients	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycerine	6.3 g
NaOH, N	1.7 g
Eau osmosée	1 L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Chlorure de Triphenyltetrazolium	25 mg
Tilt	80µL

Préparation du Tampon Van Elsas & Smalla, pour 1 litre de tampon (Van Elsas & Smalla, 1997) :

Ingrédients	Dose
NaCl	5.84 g
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	0.1 g
Sodium pyrophosphate	1 g
NaOH, N	1.7 g
Eau osmosée	1 L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Ajuster le pH à 7.2	

Préparation du milieu Sequeira modifié, pour 1 litre de milieu (Poussier et al., 2002) :

Ingrédients	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycerine	6.3 g
NaOH, N	1.7 g
Eau osmosée	1 L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Chlorure de Triphenyltetrazolium	25 mg
Tilt (propiconazole)	80 µL
Cristal violet	3 mg
Polymixine B Sulfate	10 mg
Tyrothricine	20 mg
Chloramphénicol	5 mg
Pénicilline	20 unités

Préparation de TAE (Tris-Acétate-EDTA), pour 50 litres :

Ingrédients	Dose
Tris Base	57,1 mL
Acide acétique	242 g
EDTA	37,2 g

Annexe 2 : Extraction d'ADN bactérien par le kit DNeasy (QIAGEN)

Ce protocole est dérivé de la notice QIAGEN : « **Pretreatment for Gram-Negative Bacteria + Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)** ». step 2 p.29

Le protocole recommande de travailler sur 10^9 cellules maximum, sur des suspensions bactériennes de préférence jeunes, issues de cultures de moins de 2 jours, ou sur cultures liquides d'une nuit.

1) Cultures solides

- ➔ Raclage de chaque boîte, transfert en 1 mL H₂O HPLC (stérilisée aux UV)
- ➔ Centrifugation 6500 rpm pendant 6 minutes, à 4°C
- ➔ Elimination du surnageant et ajout de 180µL de tampon ATL.

2) Phase avec Protéinase K

- 1) Ajouter 20µl de protéinase K vortexer et incuber **2H** minimum à **56°C au bain-marie**, ou au thermomixer avec des agitations occasionnelles (2 mn toutes les 15 mn environ à environ 1000 rpm), **ou à 800 rpm en agitation constante.**
- 2) **Variante : 1 nuit à T° ambiante**

La lyse est complète au bout de 1 à 3Heures en fonction des échantillons. Certains échantillons peuvent être incubés pendant 1 nuit. Après incubation, la lyse doit être matérialisée par un aspect visqueux mais non gélatineux car cela obstruerait la colonne

3) Phase avec RNase A :

- ➔ 7 µL de RNase A à 30 mg/mL (ou 21 µL à 10 mg/mL)
- ➔ Incubation 2 min à t° ambiante

4) Vortexer 15 s et ajouter **200µl de tampon AL**. Vortexer immédiatement

Un précipité blanc peut apparaître après addition du tampon. Ce précipité disparaîtra au cours de l'incubation. Le produit de lyse peut être gélatineux. Dans ce cas, agiter vigoureusement ou vortexer jusqu'à disparition.

5) Ajouter **200µl d'éthanol (96-100%)** et vortexer.

Il est important d'agiter vigoureusement afin d'obtenir une solution homogène. Dans le cas où un précipité blanc se forme, il faut absolument le transférer sur la colonne d'élution.

- 6) Pipeter le mélange obtenu et le déposer sur la colonne d'élution placée sur un tube de 2ml fourni dans le kit. Centrifuger à **6000g** (8000rpm) pendant **1min**. Séparer la colonne du tube.
- 7) Placer la colonne sur un nouveau tube de 2mL (fourni dans le kit), ajouter **500µl de tampon AW1** et centrifuger à **6000g pendant 1min**. Séparer la colonne du tube.

- 8)** Placer la colonne sur un nouveau tube de 2ml (fourni dans le kit), ajouter **500µl de tampon AW2** et centrifuger à 20000g pendant 3 min (vitesse max) afin d'assécher la membrane. Séparer la colonne du tube.

La centrifugation permet d'éliminer les dernières traces d'éthanol. Si l'on observe des traces d'éthanol dans le tube, changer de tube et centrifuger de nouveau à 20000g pendant 1min.

- 9)** Placer la colonne sur un tube de 2 mL (non fourni dans le kit) et ajouter **200µl de tampon AE** (élution) sur la colonne.
Incuber **1min à température ambiante**.
Centrifuger à **6000g pendant 1 min**.

- 10)** Renouveler l'élution 1 fois sur un nouveau tube, puis transférer le contenu dans le premier tube.

NB : Avec tube 2mL à fond ovale, les 2 éluions peuvent se faire dans le même tube.

Marquer les tubes avec étiquettes jaunes, puis stocker en cryoboîte.
Ces ADN extraits sont conservés à -30°C.

Annexe 3 : Taille des amplifiats et nombre de répétition correspondant pour chaque couple d'amorces utilisées en typage moléculaire MLVA

		Locus	Taille du motif	Nombre de répétition	Taille total	Taille fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITIONS														
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MIX 1	ch0127	18	3,6	64,8	194	129,2		147	165	183	201	219	237	255	273	291	309	327	345	363	381	399
	ch1549	9	15,6	140,4	271	130,6		140	149	158	167	176	185	194	203	212	221	230	239	248	257	266
	ch1459	7	9,9	69,3	205	135,7		143	150	157	164	171	178	185	192	199	206	213	220	227	234	241
MIX 3	ch0754C	9	22,7	204,3	399	194,7		204	213	222	231	240	249	258	267	276	285	294	303	312	321	330
	ch1844	8	8,3	66,4	289	222,6		231	239	247	255	263	271	279	287	295	303	311	319	327	335	343
	ch2433	9	5,7	51,3	291	239,7		249	258	267	276	285	294	303	312	321	330	339	348	357	366	375
		Locus	Taille du motif	Nombre de répétition	Taille total	Taille fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITIONS														
								16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
MIX 1	ch0127	18	3,6	64,8	194	129,2		417	435	453	471	489	507	525	543	561	579	597	615	633	651	669
	ch1549	9	15,6	140,4	271	130,6		275	284	293	302	311	320	329	338	347	356	365	374	383	392	401
	ch1459	7	9,9	69,3	205	135,7		248	255	262	269	276	283	290	297	304	311	318	325	332	339	346
MIX 3	ch0754C	9	22,7	204,3	399	194,7		339	348	357	366	375	384	393	402	411	420	429	438	447	456	465
	ch1844	8	8,3	66,4	289	222,6		351	359	367	375	383	391	399	407	415	423	431	439	447	455	463
	ch2433	9	5,7	51,3	291	239,7		384	393	402	411	420	429	438	447	456	465	474	483	492	501	510
		Locus	Taille du motif	Nombre de répétition	Taille total	Taille fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITIONS														
								31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
MIX 1	ch0127	18	3,6	64,8	194	129,2		687	705	723	741	759	777	795	813	831	849	867	885	903	921	939
	ch1549	9	15,6	140,4	271	130,6		410	419	428	437	446	455	464	473	482	491	500	509	518	527	536
	ch1459	7	9,9	69,3	205	135,7		353	360	367	374	381	388	395	402	409	416	423	430	437	444	451
MIX 3	ch0754C	9	22,7	204,3	399	194,7		339	348	357	366	375	384	393	402	411	420	429	438	447	456	465
	ch1844	8	8,3	66,4	289	222,6		351	359	367	375	383	391	399	407	415	423	431	439	447	455	463
	ch2433	9	5,7	51,3	291	239,7		384	393	402	411	420	429	438	447	456	465	474	483	492	501	510

MIX	Locus	Taille du motif	Taille du fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITION														
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MIX 4	CFBPch2508	13	364	282	295	308	321	334	347	360	373	386	399	412	425	438	451	464	477
	CMR026	6	298	243	249	255	261	267	273	279	285	291	297	303	309	315	321	327	333
	CMR2699	9	245	186	195	204	213	222	231	240	249	258	267	276	285	294	303	312	321
	M786	9	395	305	314	323	332	341	350	359	368	377	386	395	404	413	422	431	440
MIX 5	CFBPch0847F	9	306	240	249	258	267	276	285	294	303	312	321	330	339	348	357	366	375
	IP4134-F	6	283	223	229	235	241	247	253	259	265	271	277	283	289	295	301	307	313
	PSImp1685-F	12	327	206	218	230	242	254	266	278	290	302	314	326	338	350	362	374	386

MIX	Locus	Taille du motif	Taille du fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITION														
					16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
MIX 4	CFBPch2508	13	364	282	490	503	516	529	542	555	568	581	594	607	620	633	646	659	672
	CMR026	6	298	243	339	345	351	357	363	369	375	381	387	393	399	405	411	417	423
	CMR2699	9	245	186	330	339	348	357	366	375	384	393	402	411	420	429	438	447	456
	M786	9	395	305	449	458	467	476	485	494	503	512	521	530	539	548	557	566	575
MIX 5	CFBPch0847F	9	306	240	384	393	402	411	420	429	438	447	456	465	474	483	492	501	510
	IP4134-F	6	283	223	319	325	331	337	343	349	355	361	367	373	379	385	391	397	403
	PSImp1685-F	12	327	206	398	410	422	434	446	458	470	482	494	506	518	530	542	554	566

MIX	Locus	Taille du motif	Taille du fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITION														
					31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
MIX 4	CFBPch2508	13	364	282	685	698	711	724	737	750	763	776	789	802	815	828	841	854	867
	CMR026	6	298	243	429	435	441	447	453	459	465	471	477	483	489	495	501	507	513
	CMR2699	9	245	186	465	474	483	492	501	510	519	528	537	546	555	564	573	582	591
	M786	9	395	305	584	593	602	611	620	629	638	647	656	665	674	683	692	701	710
MIX 5	CFBPch0847F	9	306	240	519	528	537	546	555	564	573	582	591	600	609	618	627	636	645
	IP4134-F	6	283	223	409	415	421	427	433	439	445	451	457	463	469	475	481	487	493
	PSImp1685-F	12	327	206	578	590	602	614	626	638	650	662	674	686	698	710	722	734	746

MIX	Locus	Taille du motif	Taille du fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITION														
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MIX 6	827-F	9	385	334,6	343,6	352,6	361,6	370,6	379,6	389	398	407	415,6	424,6	433,6	442,6	452	461	469,6
	CFBPch1968B-F	8	300	236	244	252	260	268	276	284	292	300	308	316	324	332	340	348	356
	CMR1071-F	18	293	109	127	145	163	181	199	217	235	253	271	289	307	325	343	361	379
	CMRmp0985-F	6	284	156	162	168	174	180	186	192	198	204	210	216	222	228	234	240	246
MIX 7	CFBPch2866-F	12	216	125	137	149	161	173	185	197	209	221	233	245	257	269	281	293	305
	IP0100-F	7	200	117	124	131	138	145	152	159	166	173	180	187	194	201	208	215	222
	M1936-F	6	370	311,8	317,8	323,8	329,8	335,8	341,8	348	354	360	365,8	371,8	377,8	383,8	390	396	401,8
	M5321-F	11	217	160,9	171,9	182,9	193,9	204,9	215,9	227	238	249	259,9	270,9	281,9	292,9	304	315	325,9

MIX	Locus	Taille du motif	Taille du fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITION														
					16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
MIX 6	827-F	9	385	334,6	478,6	487,6	496,6	505,6	514,6	524	533	542	550,6	559,6	568,6	577,6	587	596	604,6
	CFBPch1968B-F	8	300	236	364	372	380	388	396	404	412	420	428	436	444	452	460	468	476
	CMR1071-F	18	293	109	397	415	433	451	469	487	505	523	541	559	577	595	613	631	649
	CMRmp0985-F	6	284	156	252	258	264	270	276	282	288	294	300	306	312	318	324	330	336
MIX 7	CFBPch2866-F	12	216	125	317	329	341	353	365	377	389	401	413	425	437	449	461	473	485
	IP0100-F	7	200	117	229	236	243	250	257	264	271	278	285	292	299	306	313	320	327
	M1936-F	6	370	311,8	407,8	413,8	419,8	425,8	431,8	438	444	450	455,8	461,8	467,8	473,8	480	486	491,8
	M5321-F	11	217	160,9	336,9	347,9	358,9	369,9	380,9	392	403	414	424,9	435,9	446,9	457,9	469	480	490,9

MIX	Locus	Taille du motif	Taille du fragment PCR chez GMI1000	Taille hors VNTR	NOMBRE DE REPETITION														
					31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
MIX 6	827-F	9	385	334,6	613,6	622,6	631,6	640,6	649,6	659	668	677	685,6	694,6	703,6	712,6	722	731	739,6
	CFBPch1968B-F	8	300	236	484	492	500	508	516	524	532	540	548	556	564	572	580	588	596
	CMR1071-F	18	293	109	667	685	703	721	739	757	775	793	811	829	847	865	883	901	919
	CMRmp0985-F	6	284	156	342	348	354	360	366	372	378	384	390	396	402	408	414	420	426
MIX 7	CFBPch2866-F	12	216	125	497	509	521	533	545	557	569	581	593	605	617	629	641	653	665
	IP0100-F	7	200	117	334	341	348	355	362	369	376	383	390	397	404	411	418	425	432
	M1936-F	6	370	311,8	497,8	503,8	509,8	515,8	521,8	528	534	540	545,8	551,8	557,8	563,8	570	576	581,8
	M5321-F	11	217	160,9	501,9	512,9	523,9	534,9	545,9	557	568	579	589,9	600,9	611,9	622,9	634	645	655,9

Annexe 4 : Stript R pour le reformattage du tableau et l'ajustement des tailles d'allèle, ici l'exemple pour le MIX 1

```
Setwd("F:/Stage M2/Stage CIRAD/DATA MOI/données génotypage R")

# Vérification des objets disponibles
dir()

#####
##### CAS du MIX 1 #####
#####

# Importation du jeu de données
JGTOM.ml <- read.table("TOM-MIX1.txt", h=T, sep="\t", dec = ".") #dec = "," ou
"."
JGTOM.ml
dim(JGTOM.ml)

# Réorganisation des individus en fonction des marqueurs et transformation # des
noms d'échantillons en facteurs
JGTOM.ml$Marker <- factor(JGTOM.ml$Marker, levels=unique(JGTOM.ml$Marker))
JGTOM.ml$Sample.Name <-
factor(JGTOM.ml$Sample.Name, levels=unique(JGTOM.ml$Sample.Name))

#Élimination des variables inutiles
JGTOM.ml$Status<-NULL
JGTOM.ml$Analysis.Method<-NULL
JGTOM.ml$Size.Standard<-NULL
JGTOM.ml$SNF<-NULL
JGTOM.ml$OS<-NULL
JGTOM.ml$SQ<-NULL
JGTOM.ml$Plate<-NULL
JGTOM.ml$Well<-NULL
JGTOM.ml$Allele.2<-NULL
JGTOM.ml$Size.2<-NULL
JGTOM.ml$AE<-NULL
JGTOM.ml$X<-NULL
JGTOM.ml$Panel<-NULL
JGTOM.ml$Allele.1<-NULL
JGTOM.ml$Sample.File<-NULL

# On vérifie s'il y a le même nombre de marqueur par échantillon
verif.mark<- data.frame(ftable(Marker~Sample.Name,data=JGTOM.ml))

# Si le résultat est nul, alors il y a une ligne par marqueur et par
# échantillon et c'est OK !
verif.mark[verif.mark$Freq!=1,]
verif.mark[verif.mark$Freq>1,]      # Pour voir les doublons

# Rajout de lignes avec NA pour les échantillons n'ayant pas été exprimés sur un
des panels
nb.echant<- verif.mark[verif.mark$Freq==0,]
```



```

JGTOM.ml <-
rbind(JGTOM.ml,data.frame(nb.echant[,c("Sample.Name","Marker")],Size.l=NA))

# Réordonner en fonction du marqueur et du nom d'échantillon
JGTOM.ml <- JGTOM.ml[order(JGTOM.ml$Sample.Name,JGTOM.ml$Marker),]

# Construction du nouveau tableau, sachant qu'on a une seule taille
# d'allèle (Rs= haplo !)
jeu <-
matrix(as.vector(t(as.matrix(JGTOM.ml[, "Size.l"]))),nrow=nlevels(JGTOM.ml$Sample.N
ame),ncol=nlevels(JGTOM.ml$Marker),byrow=TRUE)
rownames(jeu) <- levels(JGTOM.ml$Sample.Name)
nom.marqueur<- rep(levels(JGTOM.ml$Marker),each=1)

# Exportation du jeu de données final
write.table(jeu,"JGTOM.ml_export.txt", quote=F,sep="\t")

# Charge le tableau sans les titres
VALLON.ml <- read.table("JGTOM.ml_export.txt", header=TRUE, sep="\t", dec=".")
nom.loci<- c("CH0127", "CH1549", "CH1459" )

# Demande d'appuyer sur entrée entre chaque tableau
par(ask=F)
taille= c(.7,.8,1,1)
pdf("histo marqueur-ml.pdf")

# Histogramme avec un pas de 1 et le nom des tableaux 12
for (i in 1:ncol(VALLON.ml))
{
  toto <- VALLON.ml[,i]
  par(mar= c(3,4,4,0)+.1 ) #règle les marges
  hist(toto, xlab="",ylab="", main=nom.loci[i],
      br=seq(floor(min(toto,na.rm=T))-1,ceiling (max(toto,na.rm=T))+1,
      by=1)-0.5,
      xaxt="n", xlim=c(min(toto,na.rm=T)-1,max(toto,na.rm=T)+1), las=1)
  positions = floor(min(toto,na.rm=T)):ceiling (max(toto,na.rm=T))
  axis(1, positions, rep("",length(positions)), pos=0)
  if (length(positions) > 15) axis(1,
      seq(floor(min(toto,na.rm=T)),ceiling (max(toto,na.rm=T)), by=5),
      las=2, cex.axis=taille[i], pos=0)
  else axis(1, positions, las=2, cex.axis=taille[i], pos=0)
#condition pour afficher étiquettes d'abscisses tous les 5 graduations (by=5)
lorsqu'il y a plus de 15 positions par axe
}
dev.off()

#####
Analyse ses histogrammes, en comparant tailles obtenues et tailles#####
##### attendues (cf tableaux "MIX Validés Mars 2012")#####
#####

##remplace les allèles selon les classes définies à partir des histogrammes

#pour "CH0127",

```



```
VALLON.m1[,1][VALLON.m1[,1]>=188 & VALLON.m1[,1]<=190] <- 189
VALLON.m1[,1][VALLON.m1[,1]>=191 & VALLON.m1[,1]<=194] <- 193
```

#pour "CH1549"

```
VALLON.m1[,2][VALLON.m1[,2]>=152 & VALLON.m1[,2]<=154] <- 158
VALLON.m1[,2][VALLON.m1[,2]>=191 & VALLON.m1[,2]<=193] <- 194
VALLON.m1[,2][VALLON.m1[,2]>=207 & VALLON.m1[,2]<=211] <- 212
VALLON.m1[,2][VALLON.m1[,2]>=227 & VALLON.m1[,2]<=229] <- 230
VALLON.m1[,2][VALLON.m1[,2]>=251 & VALLON.m1[,2]<=253] <- 257
```

#pour "CH1459"

```
VALLON.m1[,3][VALLON.m1[,3]>=152 & VALLON.m1[,3]<=155] <- 157
VALLON.m1[,3][VALLON.m1[,3]>=162 & VALLON.m1[,3]<=164] <- 164
```

#Graphe de contrôle

```
par(ask=F)
taille= c(.7,.8,1,1)
pdf("histo marqueurmlbis.pdf")
```

Histogramme

```
for (i in 1:ncol(VALLON.m1))
{
  toto <- VALLON.m1[,i]
  par(mar= c(3,4,4,0)+.1 ) #règle les marges
  hist(toto, xlab="", ylab="", main=nom.loci[i],
       br=seq(floor(min(toto,na.rm=T))-1,ceiling (max(toto,na.rm=T))+1,
              by=1)-0.5,
       xaxt="n", xlim=c(min(toto,na.rm=T)-1,max(toto,na.rm=T)+1), las=1)
  positions = floor(min(toto,na.rm=T)):ceiling (max(toto,na.rm=T))
  axis(1, positions, rep("",length(positions)), pos=0)
  if (length(positions) > 15) axis(1,
    seq(floor(min(toto,na.rm=T)),ceiling (max(toto,na.rm=T)), by=5),
    las=2, cex.axis=taille[i], pos=0)
  else axis(1, positions, las=2, cex.axis=taille[i], pos=0)
}
dev.off()
```

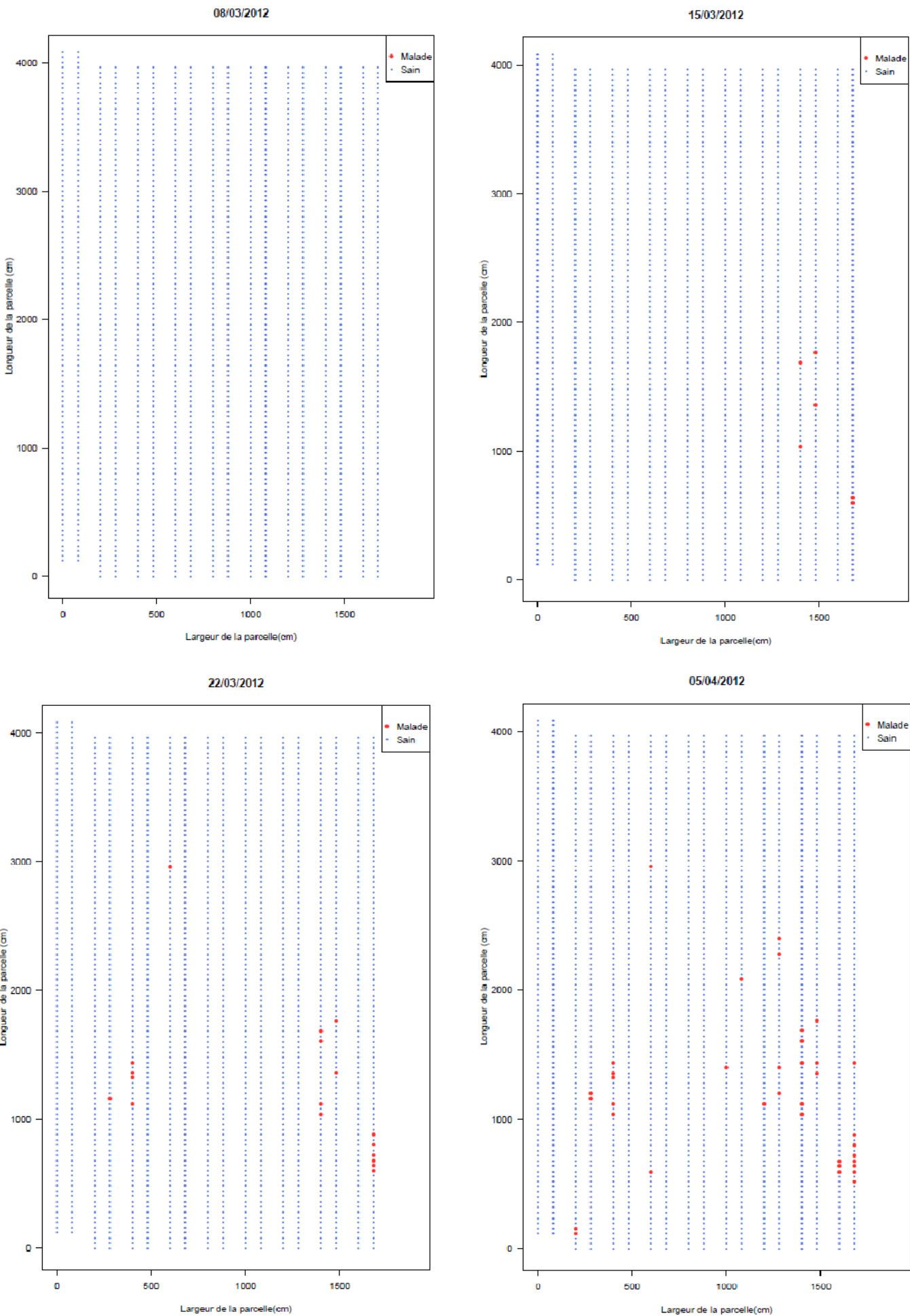
Met les noms aux allèles

```
names(VALLON.m1) <- paste(nom.loci, sep="")
VALLON.m1$samples <- row.names(jeu)
```

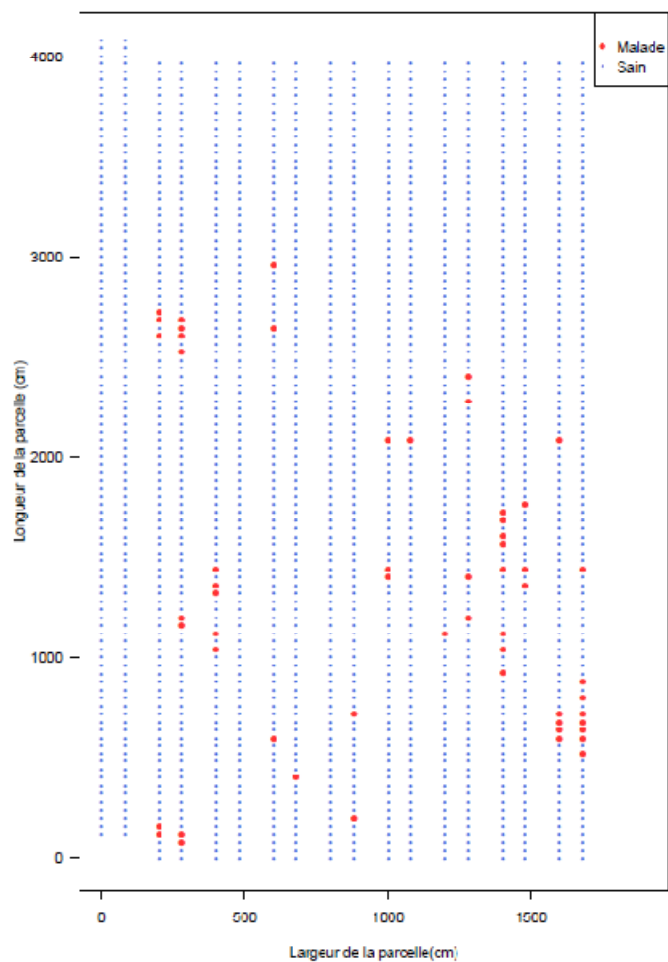
Ecrit le tableau

```
write.table(VALLON.m1, file = "VALLON-TOMATE-
Mlfinal.txt", row.names=F, quote=F, sep="\t")
```

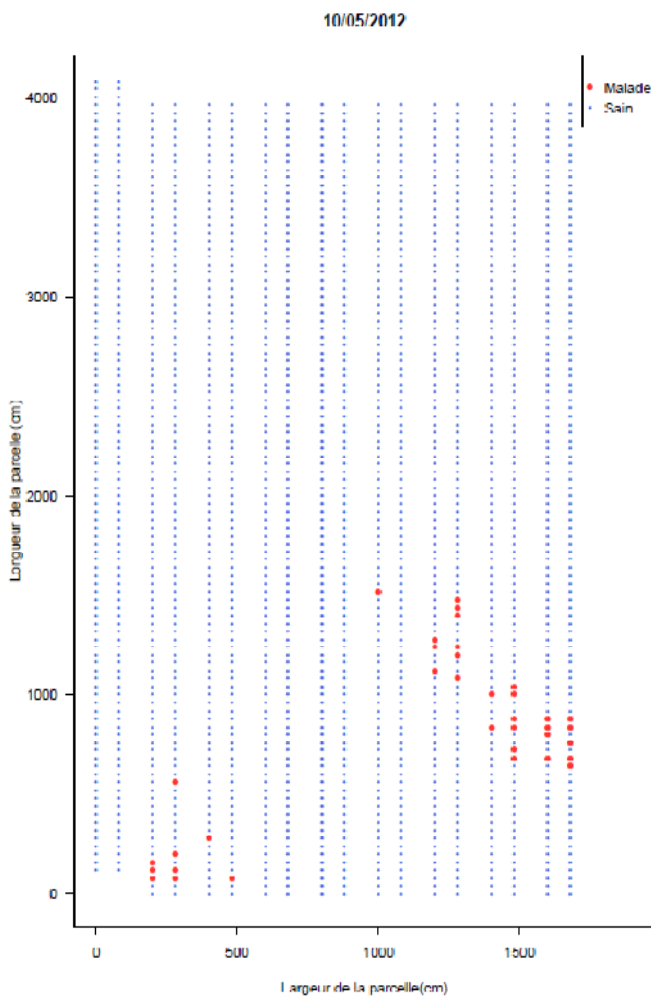
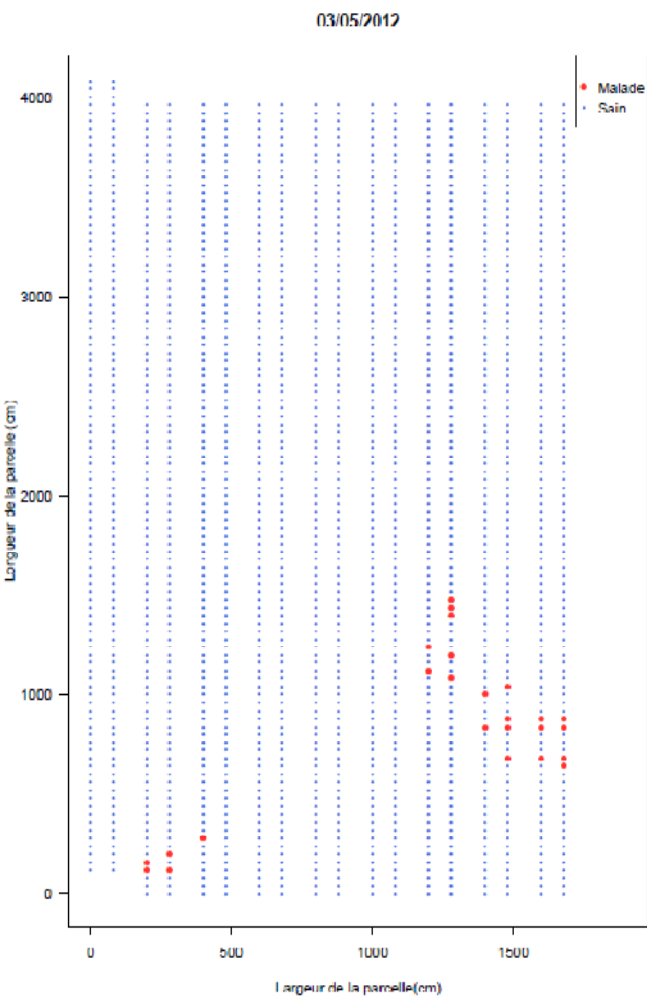
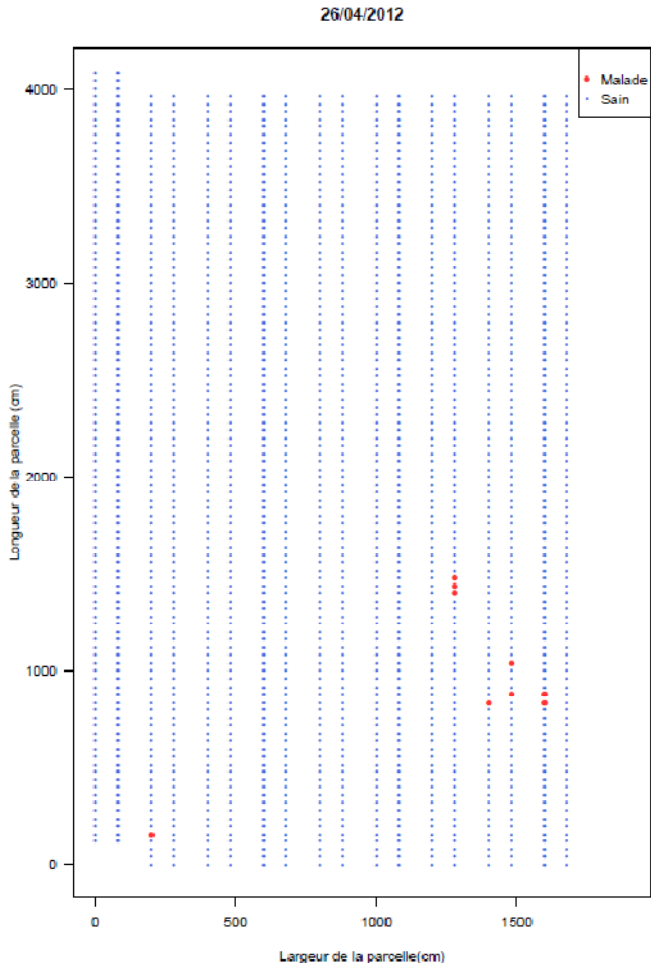
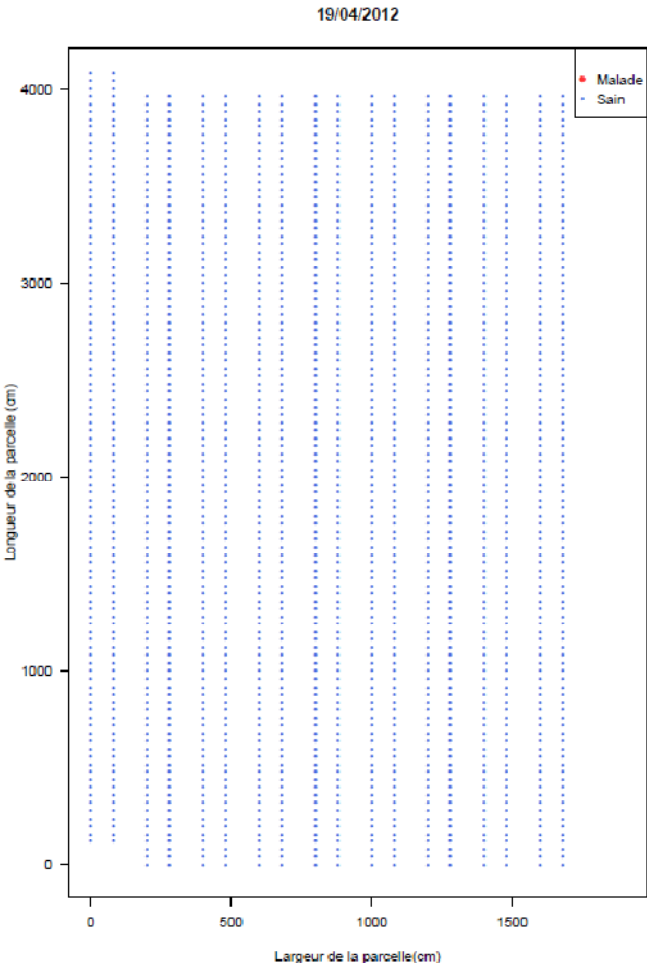

Annexe 5 : Représentation graphique du suivi hebdomadaire (5 dates) de la symptomatologie de l'infection des plants de tomate sensible (Famer 209) par le flétrissement bactérien



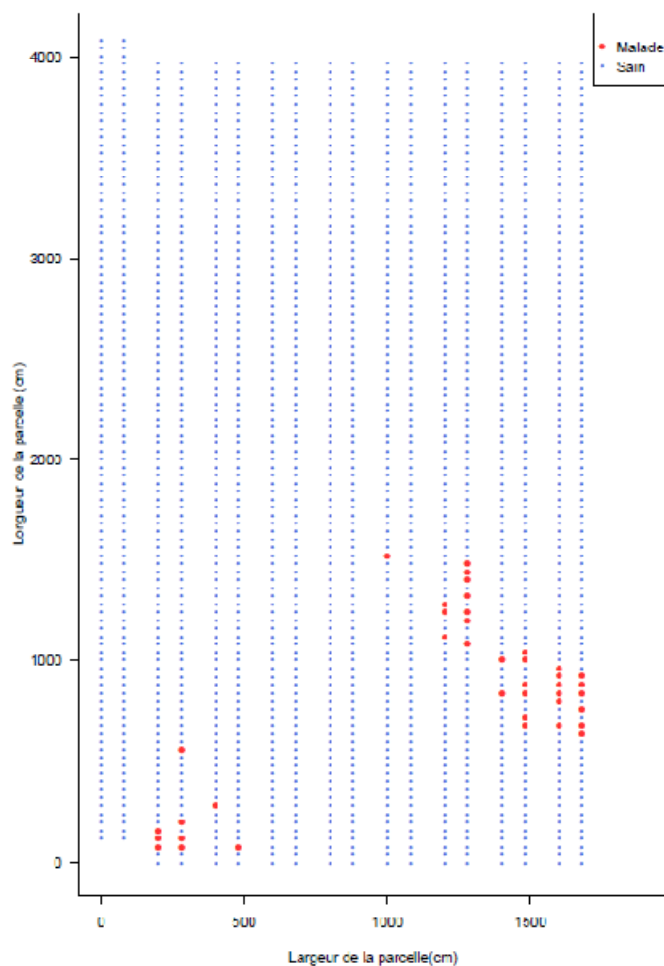
12/04/2012



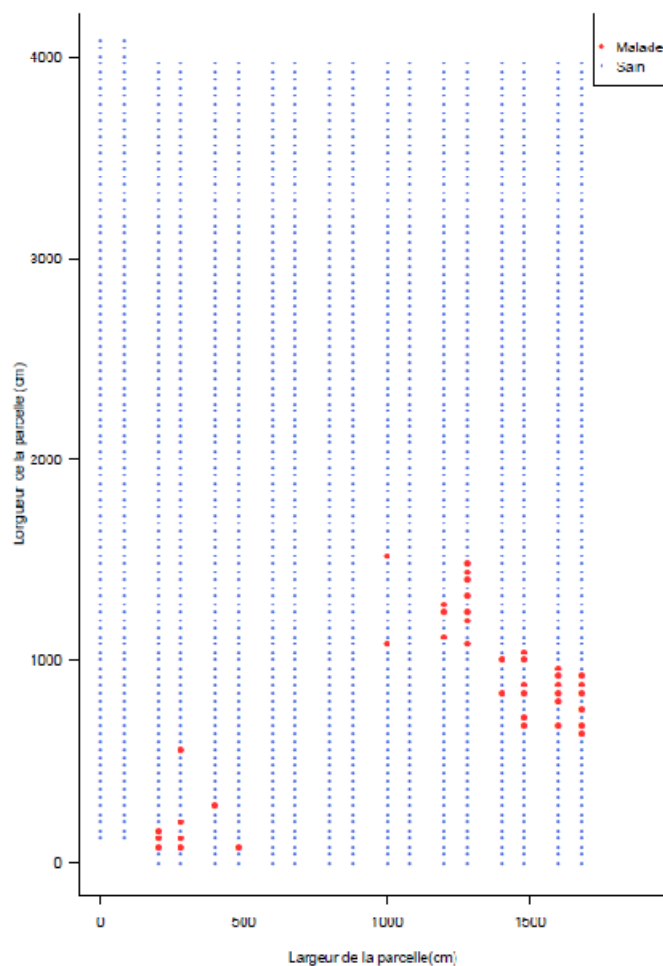
Annexe 6 : Représentation graphique du suivi hebdomadaire (10 dates) de la symptomatologie de l'infection des plants d'aubergine sensible et résistant (E8 et E6) par le flétrissement bactérien



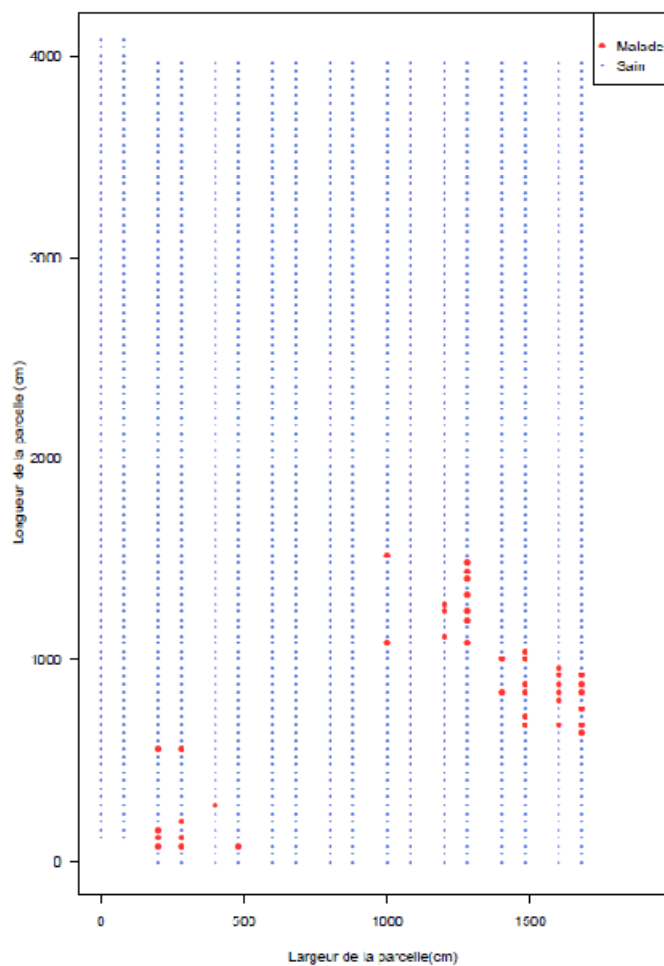
17/05/2012



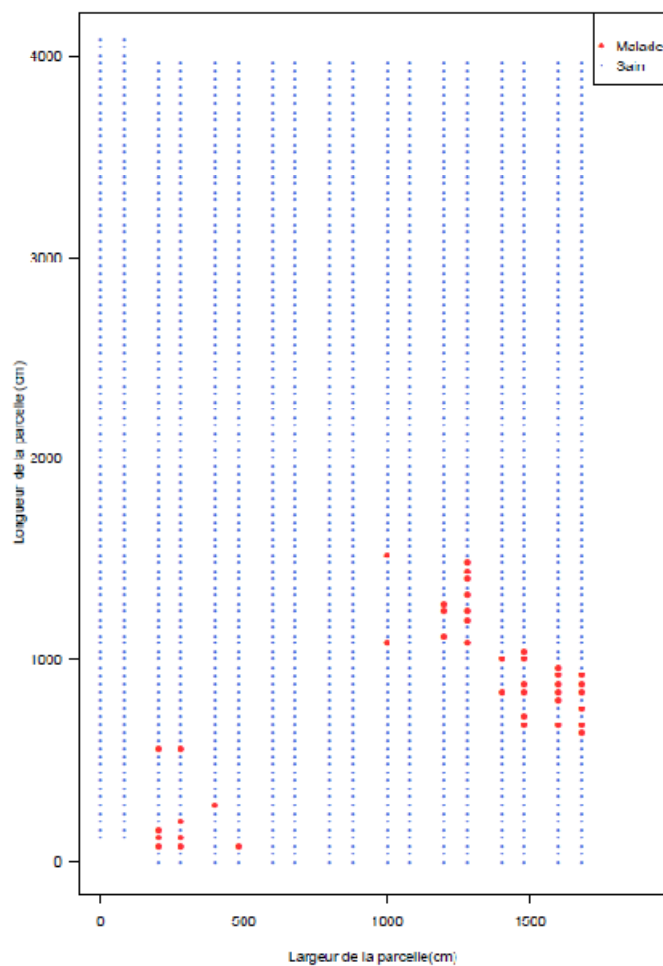
24/05/2012



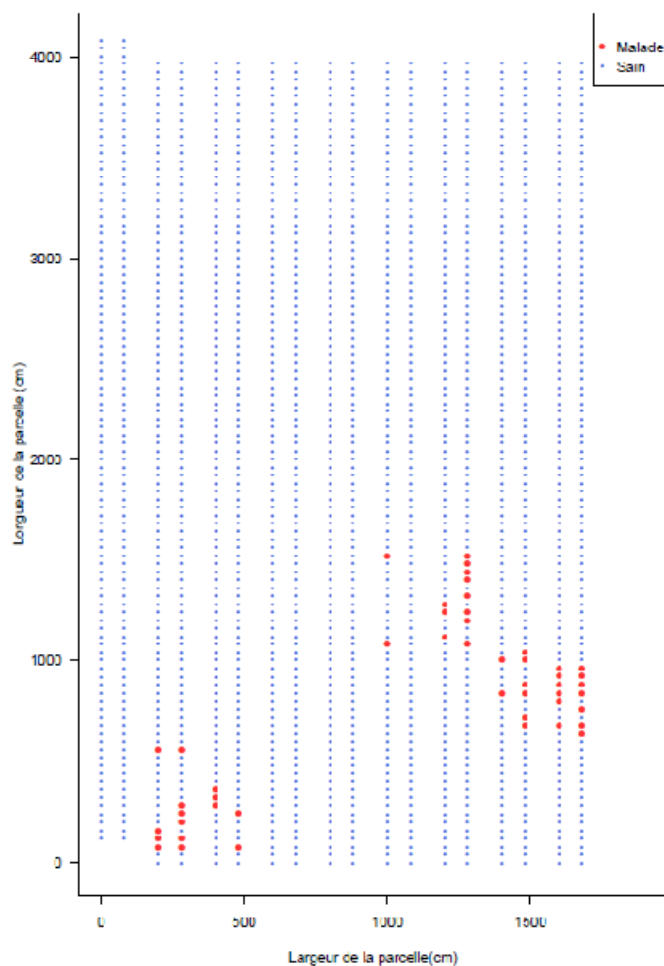
07/06/2012



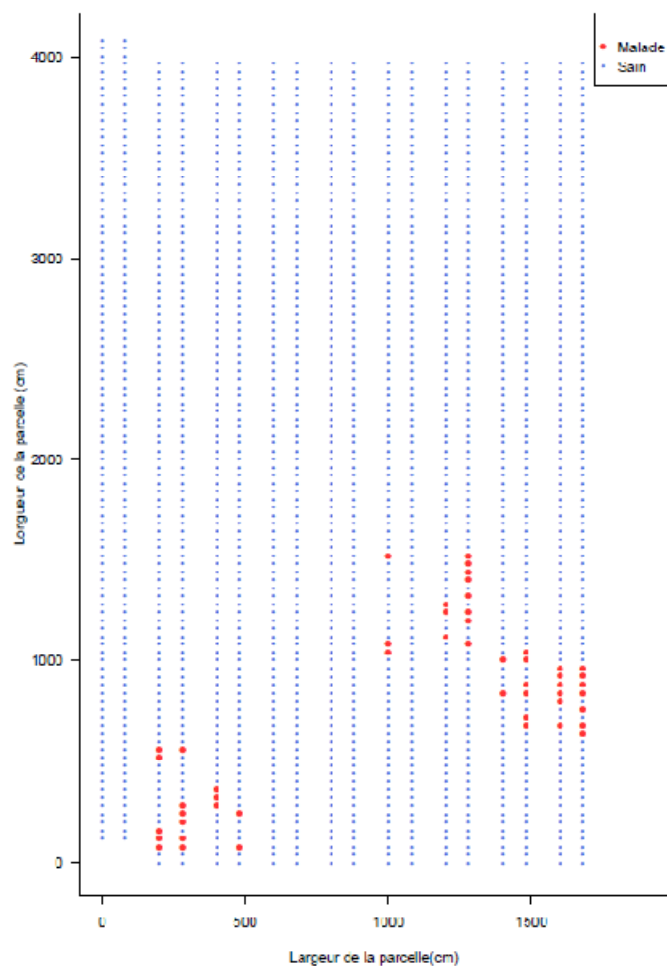
14/06/2012



28/06/2012



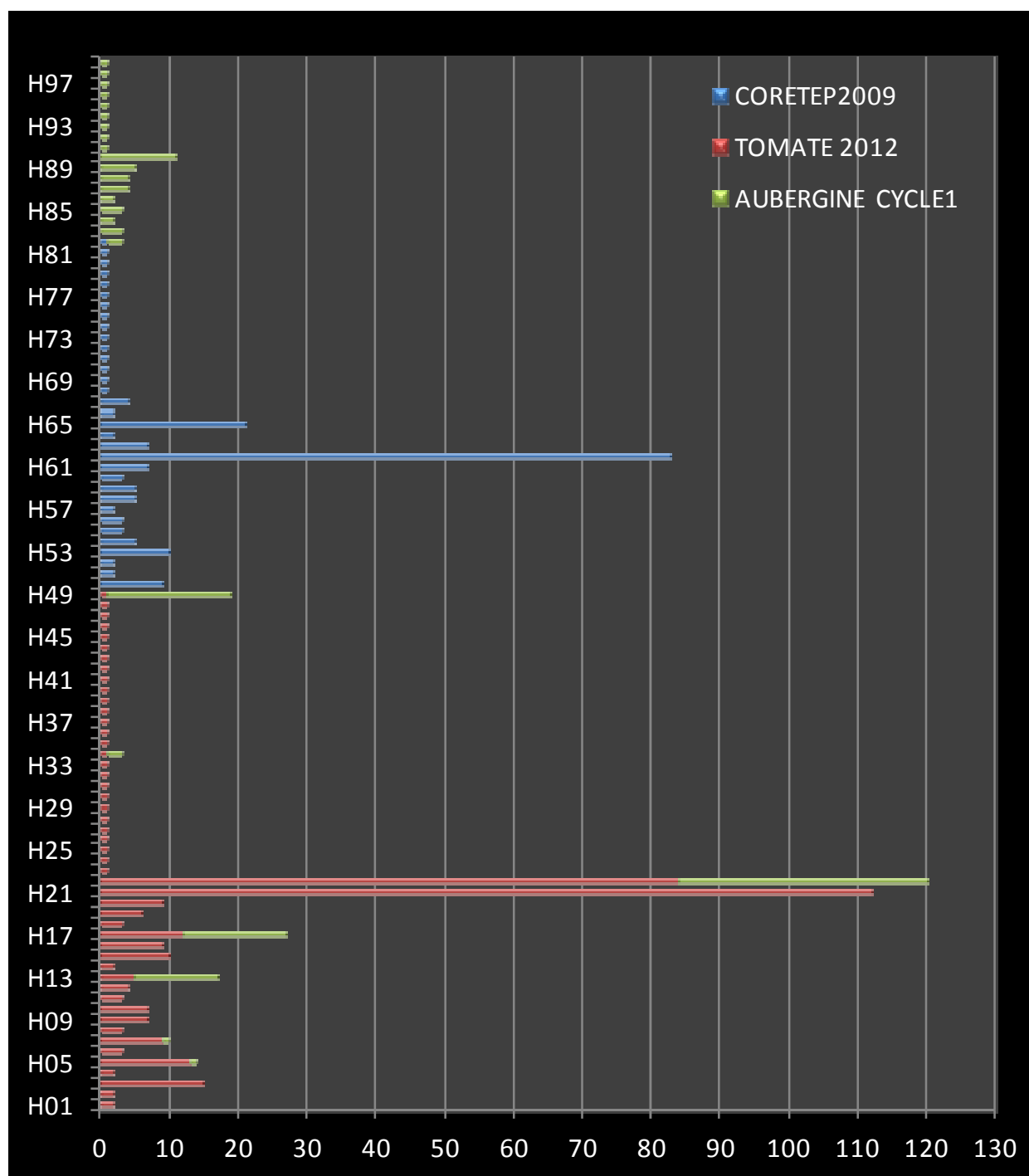
12/07/2012



Annexe 7 : Tableau récapitulatif du nombre d'haplotype ainsi que du nombre d'individus par haplotype identifié pour les populations issues (A) de l'essai CORETEP 2009, (B) du premier cycle de culture d'aubergine 2012 et (C) de l'essai tomate sensible 2012.

(A)		(B)		(C)	
Nombre d'haplotype	Nombre total d'individus par haplotype	Nombre d'haplotype	Nombre total d'individus par haplotype	Nombre d'haplotype	Nombre total d'individus par haplotype
C01	9	A01	2	H01	2
C02	2	A02	3	H02	2
C03	2	A03	2	H03	15
C04	10	A04	3	H04	2
C05	5	A05	2	H05	13
C06	3	A06	2	H06	3
C07	3	A07	4	H07	9
C08	2	A08	4	H08	3
C09	5	A09	5	H09	7
C10	5	A10	11	H10	7
C11	3	A11	12	H11	3
C12	7	A12	15	H12	4
C13	83	A13	18	H13	5
C14	7	A14	36	H14	2
C15	2	A15	1	H15	10
C16	21	A16	1	H16	9
C17	2	A17	1	H17	12
C18	4	A18	1	H18	3
C19	1	A19	1	H19	6
C20	1	A20	1	H20	9
C21	1	A21	1	H21	112
C22	1	A22	1	H22	84
C23	1	A23	1	H23	1
C24	1	A24	1	H24	1
C25	1	A25	1	H25	1
C26	1	A26	1	H26	1
C27	1	Total général	131	H27	1
C28	1			H28	1
C29	1			H29	1
C30	1			H30	1
C31	1			H31	1
C32	1			H32	1
C33	1			H33	1
Total général	190			H34	1
				H35	1
				H36	1
				H37	1
				H38	1
				H39	1
				H40	1
				H41	1
				H42	1
				H43	1
				H44	1
				H45	1
				H46	1
				H47	1
				H48	1
				H49	1
				Total général	349

Annexe 8 : Distribution des 99 haplotypes observés dans les collections CORETEP 2009, tomate 2012 et aubergine 2012 Cycle 1



Annexe 9 : (A) Structuration de la diversité sur l'essai aubergine 2012 cycle 1, entre les compartiments rhizosphère et tige des variétés E6 et E8
(B) Analyse de variance moléculaire entre compartiments de l'essai aubergine 2012 cycle 1

(A)

Groupe	Population
Rhizosphère	RD13, RO39, RM37
Tige	TD13, TO39, TM37

(B)

Source de variation	Somme des carrés	Part dans la variation totale	Pourcentage de la variation	Significativité
Entre groupes	6,774	-0,07303	-5,4	NS
Entre les populations dans les groupes	37,468	0,41668	30,81	***
Dans les populations	126,124	1,00899	74,59	***
Total	170,366	1,35264		

Annexe 9 bis : (A) Structuration de la diversité sur l'essai aubergine 2012 cycle 1, entre les compartiments d'une même variété et (B) Analyse de variance moléculaire entre variétés de l'essai aubergine 2012 cycle 1

(A)

Groupe	Population
Rhizosphère	RD13, RM37
Tige	TD13, TM37

(B)

Source de variation	Somme des carrés	Part dans la variation totale	Pourcentage de la variation	Significativité
Entre groupes	8,7	-0,07789	-5,2	NS
Entre les populations dans les groupes	25,444	0,42293	28,22	***
Dans les populations	123,424	1,15349	76,97	***
Total	157,568	1,49854		

Pour citer ce rapport :

Guinard Jérémy (2012), Structuration génétique d'une population parcellaire de *Ralstonia solanacearum* et impact d'une culture d'aubergine résistante. Master 2 en sciences et technologies "Agronomie et agroalimentaire" spécialité : Systèmes et techniques innovants pour un développement agricole durable (STIDAD) parcours : Semences et plants méditerranéens et tropicaux (SEPMET), Montpellier Supagro, 75p.

Résumé

Rasltonia solanacearum, une bêta-proteobactérie d'origine tellurique, responsable du flétrissement bactérien sur de nombreuses solanacées maraîchères. Il est nécessaire de connaître la biologie d'un organisme phytopathogène, sa structure génétique et de son mode de transmission afin de mettre en place de stratégie de sélection de résistance durable pour éviter tout contournement de résistance. Ainsi cette étude s'attache dans un premier temps à caractériser la structure génétique des souches de *R. solanacearum* naturellement présente dans notre parcelle et dans un second temps d'évaluer l'effet de la culture d'une variété résistante sur la structure de cette population. 670 souches provenant de 3 essais spatio-temporellement différents ont été extraites et identifiées comme appartenant au phylotype I de *R. solanacearum*. Le génotypage de ces souches à l'aide de 13 loci minisatellites (VNTR) spécifique au phylotype I a révélé une faible variabilité génétique au sein de notre collection de souche ainsi qu'un très faible polymorphisme des marqueurs utilisés ; seul CMR0985 est polymorphe. De plus, on observe une faible diversité génétique au sein de notre parcelle avec un H_e compris entre 0,00 et 0,53 et 99 haplotypes identifiés. Cependant un gradient de diffusion vertical est visible par observation symptomatologique confirmée par des analyses de la variance moléculaire (AMOVA) et par les F_{st} . On observe aussi un effet filtre de la plante avec un taux de recombinaison plus fort chez les populations issues de tomates et d'aubergine résistante. Pour les aubergines résistantes, une baisse de la diversité des populations bactériennes a été observée ainsi qu'une diversité différentielle entre les compartiments. Le fond génétique de l'espèce végétale semblerait influencer les structures génétiques de populations pathogènes. Ces résultats restent cependant à confirmer notamment par le développement de marqueurs moléculaires spécifiques au phylotype I et par la collecte de nouvelles souches afin de suivre l'évolution de la maladie sous pression de sélection. (303 mots)

Mots clés : *Rasltonia solanacearum*, structure génétique, minisatellites, phylotype I, épidémiologie moléculaire.

Abstract

Rasltonia solanacearum is a soilborn beta-proteobacterium responsible for bacterial wilt on *Solanaceae*. Understanding the biology of this bacterium, its population genetics and its transmission system is crucial for choosing the appropriate resistance-breeding program in order to minimise the likelihood that the pathogens overcome the resistance. The aim of this study was on the one hand to characterise the genetic structure of *R. solanacearum* strains in our naturally infested field and on the other hand to evaluate the impact of a resistant culture on this genetic structure. A total of 670 strains from three different assays were extracted from xylem, soil and rhizosphere and identified as part of the phylotype I classification of *R. solanacearum*. The typing of these strains was realised with 13 minisatellites loci (also called VNTR) phylotype-I specific and revealed a weak genetic variability between our three collections of strains. It also showed that our markers were highly monomorphic (excepts CMR0985). Moreover, we observed a poor genetic diversity of the strains from our field with a H_e ranging between 0,00 and 0,53 and 99 different haplotypes. Interestingly, we identified a vertical gradient of the disease by symptomatic observation which was confirmed by molecular analysis (AMOVA and F_{st}). Our results also showed that there is a higher recombination rate in bacteria extracted from resistant plants than from susceptible plants. We observed a reduction of the genetic diversity of bacterial populations from resistant eggplants and a differential genetic diversity between populations from the xylem and the rhizosphere. Genetic backgrounds seemed to influence genetic structure of the pathogen. These results need to be confirmed by the development of molecular marker phylotype I specific. *R. solanacearum* evolution under selection pressure will be further investigated by collecting new strains from the next culture of susceptible and resistant eggplant. (294 words)

Key words: *Rasltonia solanacearum*, genetic structure, minisatellites, phylotype I, molecular epidemiology.